

SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS

**PRESENÇA DO *PAPILOMAVÍRUS HUMANO* (HPV) EM LEUCOPLASIA E
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES
DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR.**

CAMPO GRANDE- MS

2021

SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS

PRESENÇA DO *PAPILOMAVÍRUS HUMANO* (HPV) EM LEUCOPLASIA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR.

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de doutor pelo Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Ines Aparecida Tozetti.

CAMPO GRANDE-MS

2021

AGRADECIMENTOS

À professora Dr.^a Inês Aparecida Tozetti pela orientação e amizade, por sempre me atender prontamente nas demandas relativas ao doutorado, projeto de pesquisa e utilização do laboratório, permitindo o desenvolvimento da pesquisa e meu aprendizado com técnicas de biologia molecular.

Às professoras Dr.^a Daniella Moraes Antunes minha coorientadora do Doutorado e Dr.^a Rosana Mara Giordano de Barros que possibilitaram meu acesso ao atendimento aos pacientes nas Clínicas de Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFMS (FAODO) e me auxiliaram na seleção dos participantes da pesquisa e realização das coletas.

Aos técnicos de laboratório Dr.^a Camila Mareti Bonin Jacob, Cláudio Gonçalves Oliveira e Silvia Roberta Cieslak Sanches pelo desenvolvimento das técnicas laboratoriais que permitiram a análise das lâminas histológicas.

Aos colaboradores do projeto de pesquisa, Prof.^a Dr.^a Alda Maria Teixeira Ferreira e Dr.^a Larissa Zatorre Almeida Lugo pela orientação quanto ao desenvolvimento e análise dos resultados das técnicas de biologia molecular e Prof.^a Dr.^a Cacilda Tezelli Junqueira Padovani nas orientações quanto ao desenvolvimento da técnica de imunohistoquímica.

Às profissionais da odontologia que auxiliaram nas coletas do material biológico durante atendimento aos pacientes nas clínicas de odontologia, Hélen Marília Machado Ribas, Adriana Marcela L. Rocha e Magda Yuri Fukuda.

À colega de doutorado e prof.^a Dr.^a Andréia Insabralde de Queiroz Cardoso pela colaboração na confecção do artigo científico, pela amizade e atenção sempre dispendidas para o desenvolvimento das atividades do doutorado.

Ao professor Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes pela importante contribuição relacionada as análises estatísticas e orientação quanto a interpretação dos resultados encontrados.

Às alunas de iniciação científica Samella Gabrielly Medeiros, Fernanda Pereira de Moraes e Gabriella Teles Burkner e pós-graduandas Jennifer Naed Martins de Freitas e Andrielli Rodrigues dos Santos por desenvolverem as técnicas de biologia molecular e imuno-histoquímica para análise das amostras.

Grata ao meu esposo Sergio que sempre de prontidão me auxilia em tudo, procurando atender minhas necessidades e da minha família que é o esteio que me apoia e um objetivo maior de existir.

Grata a Deus pela vida e tantas oportunidades de aprendizado ao longo desta existência.

RESUMO

A caracterização do Papilomavírus humano (HPV) como agente etiológico da leucoplasia e carcinoma da cavidade oral ainda é controversa, embora já identificado o seu envolvimento no câncer de orofaringe. Estas lesões na cavidade oral têm fatores de risco em comum existindo a possibilidade de que a infecção por HPV possa favorecer a transformação maligna da leucoplasia progredindo para carcinoma epidermoide oral (CEO). Este trabalho objetivou identificar através de métodos de biologia molecular a presença do HPV em leucoplasia e CEO, assim como sua relação com a expressão de p16, p21, ki67 e CK14 e CK19 envolvidas na regulação do ciclo celular, proliferação e diferenciação celular. Para detecção de DNA-HPV pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram obtidas amostras de células esfoliadas da superfície das lesões e de outras regiões da mucosa oral sem alterações em pacientes atendidos nas Clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAODO) e Centro de Especialidades Odontológicas do Município de Campo Grande (CEO - SESAU) no período de setembro de 2018 a novembro de 2020, classificadas clinicamente como leucoplasia oral (n=22) e carcinoma epidermoide oral (n=15). Amostras das lesões foram obtidas por biópsia e emblocadas em parafina e divididas em grupos de acordo com a ausência ou presença de displasia ou neoplasia na avaliação histopatológica. Na identificação da expressão de p16, p21, Ki67, CK14 e CK19 os blocos foram analisados por técnica de imuno-histoquímica de marcação simples. A frequência de detecção do HPV foi de 27% dos pacientes que participaram da pesquisa. Não houve diferença estatística quanto ao aumento da expressão da p16 ($p=0,093$) e Ki67($p=0,169$) entre os tipos de lesões estudadas. Foi observada diferença estatística na expressão por CK19 e p21 ($p<0,001$) entre os grupos de lesões avaliadas e na expressão difusa moderada de CK14 ($p=0,015$), que foi significativamente menor em leucoplasias sem displasia. Na comparação entre amostras positivas e negativas para HPV, verificou-se apenas o aumento da expressão de ki67 com diferença significativa ($p<0,001$) em amostras positivas para HPV. O aumento da expressão dos marcadores estudados parece ter relação com o grau de displasia ou malignidade das lesões, com exceção da expressão de p16 que não estava relacionada a malignidade nem presença de DNA viral. A presença do HPV associada ao aumento de expressão de ki67 indica a interferência viral na capacidade proliferativa do epitélio oral.

Palavras-chave: Leucoplasia, Papilomavirus humano (HPV), Carcinoma epidermoide.

ABSTRACT

The characterization of human papillomavirus (HPV) as the etiologic agent of leukoplakia and carcinoma of the oral cavity is still controversial, although its involvement in oropharyngeal cancer has already been identified. These lesions in the oral cavity have risk factors in common, with the possibility that HPV infection may favor the malignant transformation of leukoplakia progressing to oral squamous cell carcinoma (OEC). This work aimed to identify, through molecular biology methods, the presence of HPV in leukoplakia and carcinoma, as well as its relationship with the expression of p16, p21, ki67 and CK14 and CK19 related to the cell cycle, in its cell proliferation and differentiation. For detection of HPV-DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR), samples of exfoliated cells from the surface of the lesions and from other regions of the oral mucosa without alterations in patients treated at the Clinics of the Faculty of Dentistry of the Federal University of Mato Grosso do Sul and the Center for Dental Specialties from the Municipality of Campo Grande from September 2018 to November 2020, clinically classified as oral leukoplakia (n=22) and oral squamous cell carcinoma (n=15). Lesions samples were obtained by biopsy and embedded in paraffin and divided into groups according to the absence or presence of dysplasia or neoplasia in the histopathological evaluation. To identify the expression of p16, p21, Ki67, CK14 and CK19, the blocks were analyzed using a simple immunohistochemical technique. The frequency of HPV detection was 27% of patients who participated in the survey. There was no statistical difference regarding the increase in the expression of p16 ($p=0,093$) and Ki67 ($p=0,169$) between the types of lesions studied. A statistical difference was observed in the expression of CK19 and p21 ($p<0.001$) between the groups of evaluated lesions and in the moderate diffuse expression of CK14 ($p=0.015$), which was significantly lower in leukoplakia without dysplasia. When comparing positive and negative samples for HPV, there was only an increase in ki67 expression with a significant difference ($p<0.001$) in samples positive for HPV. The increased expression of the studied markers seems to be related to the degree of dysplasia or malignancy of the lesions, with the exception of p16 expression, which was not related to malignancy or the presence of viral DNA. The presence of HPV associated with increased expression of ki67 indicates viral interference in the proliferative capacity of the oral epithelium.

Keywords: Leukoplasia, Human Papillomavirus (HPV), Epidermoid Carcinoma.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com as variáveis, sexo, faixa etária, raça, estado civil, grau de escolaridade em Campo Grande, MS – 2021.....69
- Tabela 2 – Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com variáveis, idade da primeira relação, número de parceiros sexuais nos últimos 2 anos, número de parceiros sexuais desde a primeira relação sexual, uso de preservativo, pratica de sexo oral, relato de IST, em Campo Grande, MS – 2021.....70
- Tabela 3 – Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com variáveis, uso de drogas, uso de tabaco, ingestão de álcool, uso de remédios, lesão anterior na boca, uso de prótese dentária, em Campo Grande, MS – 2021.....71
- Tabela 4 – Distribuição das amostras dos indivíduos que participaram da pesquisa, segundo tipo de lesão baseado em laudo histopatológico, em Campo Grande – 2021.....73
- Tabela 5 – Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com o tipo de lesão, segundo sexo, idade, local da lesão, uso de tabaco e ingestão de álcool, em Campo Grande – MS.....76
- Tabela 6 – Positividade para detecção do HPV detectada por PCR nos participantes da pesquisa, segundo sexo, idade, local da lesão, uso de tabaco e ingestão de álcool, em Campo Grande – MS.....79
- Tabela 7 – Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com a expressão de p16 detectada por IHQ, segundo tipo de lesão e positividade HPV na mucosa oral, em Campo Grande, MS – 2021 (n=37).....81
- Tabela 8 – Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com a expressão de CK14 detectada por IHQ nas camadas epiteliais, segundo tipo de lesão e positividade para HPV na mucosa oral, Campo Grande, MS – 2021 (n=37).....83

Tabela 9 – Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com a expressão de CK19 detectada por IHQ nas camadas epiteliais, segundo tipo de lesão e positividade para HPV na mucosa oral, Campo Grande, MS – 2021 (n=37)	85
Tabela 10 – Médias da contagem de células com expressão nuclear de p21 detectada por IHQ, segundo tipo de lesão e positividade para HPV na mucosa oral, Campo Grande, MS – 2021 (n=37)	87
Tabela 11 – Médias da contagem de células com expressão nuclear de ki67 detectada por IHQ, segundo tipo de lesão e positividade HPV na mucosa oral, Campo Grande, MS – 2021 (n=37)	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama da árvore filogenética contendo a sequência de 118 tipos de Papilomavírus.....	22
Figura 2 - Representação esquemática da organização do genoma dos tipos alfa e beta do HPV. O genoma de DNA circular dos tipos alfa e beta de alto risco para HPV é representado por um círculo preto.....	23
Figura 3 - Mecanismo de entrada do HPV na célula basal epitelial para integração do DNA viral na célula hospedeira.....	28
Figura 4 - Organização do Ciclo de vida do HPV.....	30
Figura 5 - Representação esquemática da atuação de p16 na regulação do ciclo celular.....	43
Figura 6 - Mecanismo de ciclo celular normal e em células infectadas por HPV.....	44
Figura 7 - Representação esquemática da regulação das atividades do complexo ciclina-E-CDK2 e ciclina-A-CDK2 que são responsáveis pela transição celular da fase G1 para a S e progressão na fase S, respectivamente.....	46
Figura 8 - Representação esquemática das principais interações de p21 com proteínas no núcleo e no citoplasma.....	48
Figura 9 - Representação esquemática das oncoproteínas virais E6 e E7 na inibição da apoptose induzida por HPV de alto risco oncogênico.....	49
Figura 10 – Achados histopatológicos das biópsias da lesão de cavidade oral corados em H.E. de pacientes que participaram da pesquisa - Campo Grande – MS, 2021.....	74
Figura 11 – Padrão de expressão de p16 detectada por IHQ em tonsila humana e biópsia da lesão em mucosa oral de participantes da pesquisa – Campo Grande – MS, 2021.....	80
Figura 12 – Padrão de expressão de CK14 detectada por IHQ em pele humana e biópsia da lesão em cavidade oral de pacientes que participaram da pesquisa – em Campo Grande – MS, 2021.....	82

Figura 13 – Padrão de expressão de CK19 detectada por IHQ em pele humana e biópsia da lesão em cavidade oral de pacientes que participaram da pesquisa – em Campo Grande – MS, 2021.....	84
Figura 14 – Padrão de expressão de p21 detectada por IHQ em câncer cervical e biópsia da lesão em cavidade oral de pacientes que participaram da pesquisa – em Campo Grande – MS, 2021.....	86
Figura 15 – Padrão de expressão de ki67 detectada por IHQ em tonsila humana e em biópsia de lesão da mucosa oral de pacientes que participaram da pesquisa – em Campo Grande – MS, 2021.....	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

CEO	Carcinoma epidermoide oral
HPV	Papilomavírus Humano (do inglês Human Papillomavirus)
HPVs	Papilomavírus Humanos (do inglês Humans Papillomavirus)
HR-HPV	Papilomavirus Humano de alto risco oncogênico (do inglês HIGH RISC-HR)
LR- HPV	Papilomavirus Humano de baixo risco oncogênico (do inglês LOW RISC-LR)
CKs	Citoqueratinas (do inglês Citokeratins)
CK	Citoqueratina (do inglês Citokeratin)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês Desoxyribonucleic Acid)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)
mRNA	RNA mensageiro
URR	Região Reguladora (do inglês Upstream Regulation Region)
CDK	Quinase ciclina-dependente (do inglês Cyclin-dependent Kinase)
CDKI	Inibidor de quinase ciclina-dependente (do inglês Cyclin-dependent Kinase Inhibitor)
pRB	Proteína do Retinoblastoma
Ki67	Marcador de proliferação celular
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês Human leukocitary Antigen)
IHQ	Imuno-histoquímica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês Sodium dodecyl sulfate)

DAB	3,3-diaminobenzidina
PBS-BSA	Tampão fosfato salino – Soro Albumina Bovina (do inglês Phosphate Buffered Saline - Bovine Serum Albumine)
TBS	Tampão Tris Salino (do inglês Tris Buffered Saline)
pb	Par de base
ND10	Domínio nuclear 10 (do inglês nuclear domain)
Top BP1	Proteína 1 ligante de DNA topoisomerase (do inglês topoisomerase binding protein 1)
Brd4	Proteína do domínio-bromo 4 (Bromodomain-containing protein 4)
TGF- α	Fator de crescimento e transformação α (do inglês Transforming Growth Factor Alpha)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês Epidermal growth factor)
EGFR	Receptor de crescimento epidérmico (do inglês epidermal growth factor receptor)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (do inglês International agency for research on cancer)
INCA	INSTITUTO NACIONAL DO CANCER
LCR	Região longa de controle (do inglês long control region)
E	Região precoce (do inglês early region)
L	Região tardia (do inglês late region)
Bcl-2	Gene do linfoma 2 de células B (do inglês B-cell lymphoma 2)
CCND	Gene que codifica ciclina D (do inglês gene encodes the cyclin D protein)
ERBB2	Gene que codifica receptor tirosina quinase humana 2 (do inglês receptor human tyrosine kinase 2).

FGF3	Gene da família do fator de crescimento do fibroblasto 3 (do inglês gene family fibroblast growth factor).
HRAS	Gene da proteína humana do sarcoma do vírus do rato (do inglês Rat sarcoma vírus human protein)
myc	Gene da mielocitomatose (do inglês myelocytomatosis)
INK-4/ARF	Gene supressor tumoral
ras/raf	Via de proteínas quinase de transdução de sinais
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês mitogen-activated protein kinase)
PI3K	Via fosfatidilinositol-3-quinase (do inglês Phosphoinositide 3-kinase),
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição (Signal Transducer and Activator of Transcription)
PKC	Proteína quinase C (do inglês kinase protein C)
PCNA	Antígeno nuclear de célula em proliferação (do inglês proliferation cell nuclear antigen)
hTERT	Transcriptase reversa da telomerase humana (do inglês human telomerase reverse transcriptase)
p16	Proteína supressora tumoral 16 KDa
p21	Proteína supressora tumoral 21 KDa
p53	Proteína supressora tumoral 53 KDa
Cip	Proteínas de interação com quinase ciclina-dependente (do inglês Cyclin-dependent Kinase interacting protein)
Kip	Proteína inibidora de Kinase (do inglês Kinase inhibitory protein)
P670	Proteína promotora viral 670
P811	Proteína promotora viral 811

P742	Proteína promotora viral 742
G1	Fase crescimento (do inglês growing)
S	Fase síntese (do inglês syntesis)
EIA	Ensaio Imunoenzimático
IST	Infecção sexualmente transmissível
HE	Hematoxilina e Eosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Papilomavirus humano (HPV).....	21
2.1.1 Estrutura Viral.....	21
2.1.2 Tipos virais e potencial oncogênico.....	24
2.1.3 Patogenia da Infecção Viral.....	26
2.1.4 Métodos para detecção do HPV.....	31
2.2 Leucoplasia Oral.....	34
2.3 Carcinoma epidermoide oral (CEO).....	37
2.4 Proteínas envolvidas na Proliferação e Ciclo Celular.....	42
2.4.1 Proteína reguladora de ciclo celular - p16.....	42
2.4.2 Proteína reguladora de ciclo celular - p21	46
2.4.3 Proteína Ki67.....	50
2.5 Citoqueratinas (CKs).....	53
3 OBJETIVOS	58
3.1 Geral.....	58
3.2 Específicos	58
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Caracterização do estudo	59
4.2 Local da pesquisa	59
4.3 Participantes da pesquisa	59
4.4 Dados Secundários	60

4.5 Procedimentos e técnicas	60
4.5.1 Coleta das amostras	60
4.5.2 Reação em cadeia da Polimerase	61
4.5.2.1 Extração das amostras	61
4.5.2.2 Dosagem	62
4.5.2.3 <i>Nested</i> PCR PGMY/GP+	62
4.5.2.4 Detecção dos produtos da PCR	62
4.5.3 Análise Histopatológica	63
4.5.4 Imuno-histoquímica de marcação simples	64
4.5.5 Avaliação quantitativa das lâminas submetidas à técnica de imuno-histoquímica	65
4.5.6 Avaliação qualitativa das lâminas submetidas à técnica de imuno-histoquímica	66
4.6.7 Analise Estatística	67
4.5.8 Aspectos éticos	67
5 RESULTADOS	68
5.1 População em estudo	68
5.2 Laudo Histopatológico	73
5.3 Detecção do DNA-HPV	77
5.4 Análise imuno-histoquímica	80
5.4.1 Expressão de p16	80
5.4.2 Expressão de CK14 e CK19	81
5.4.3. Expressão de p21 e ki67	86
6 DISCUSSÃO	90

7 CONCLUSÕES	113
8 REFERÊNCIAS	114
APENDICE A	131
APENDICE B.....	133
ANEXO I	134
ANEXO II	135
ANEXO III	136

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a infecção pelo *Papilomavírus humano* (HPV) tornou-se um problema de saúde pública devido ao seu envolvimento em vários tipos de câncer como aqueles que afetam o colo do útero, a região anogenital e a orofaringe (BOGUÑÁ; CAPDEVILA; JANÉ-SALAS, 2019). De acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE, em 2014, houve crescimento mundial da incidência do câncer de orofaringe relacionado ao HPV, vírus que antes era associado prioritariamente ao câncer do colo do útero.

O *Papilomavírus humano* (HPV) é um vírus de DNA circular de dupla fita que tem afinidade por células epiteliais, causando lesões em pele e mucosa. Mais de 200 subtipos do vírus são conhecidos e classificados em relação ao seu potencial oncogênico, como de alto ou baixo risco oncogênicos (GHEIT, 2019).

O HPV exerce o seu potencial oncogênico expressando as proteínas virais E6 e E7 em células hospedeiras infectadas, incorporando o DNA viral ao DNA celular para sua replicação, especialmente relacionado aos tipos 16 e 18 o que aumenta o risco de progressão maligna das lesões (SIMONATO et al., 2016).

O envolvimento do HPV com o câncer de orofaringe já é um consenso para a literatura, no entanto, uma possível associação com carcinoma de boca e sua relação com o desenvolvimento de lesões potencialmente malignas ou a progressão neoplásica na cavidade oral, ainda permanece como tema em discussão. Esta temática torna-se também relevante quando se considera medidas profiláticas a que se pode lançar mão, como as vacinas que mostram uma boa eficiência quanto aos tipos virais a que estão direcionadas, já que vacinas podem reduzir a taxa de infecção por HPV, malignidades orofaríngeas e doenças afins em ambos os sexos (KUMAR; BISWAS; JOSE, 2015).

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é o sexto câncer comum em todo o mundo, com quase 600.000 novos casos relatados anualmente e o carcinoma epidermoide oral (CEO) é o tumor maligno mais comum nesta localização anatômica (GISSI et al., 2018). O câncer na cavidade oral tem ampla localização definida pela 10ª revisão da International Classification of Disease, a qual inclui o câncer dos lábios, língua, gengiva, assoalho da boca, palato, mucosa da bochecha (jugal), vestíbulo da

boca ou área retromolar (Figura 1). A maior prevalência do câncer oral ocorre entre homens, grupos de idade mais avançada e indivíduos de origem mais pobre (PERES et al., 2019)

Dentre as lesões potencialmente neoplásicas consideradas precursoras para o câncer bucal e a mais comum da cavidade oral, está a leucoplasia, sendo considerada de maior risco para o desenvolvimento da neoplasia (LEE et al., 2000). Clinicamente, apresenta-se como uma placa branca podendo guardar características, na análise histopatológica, de uma hiperplasia epitelial com hiperqueratose, displasias de variados graus ou até mesmo um neoplasma localizado ou invasivo.

Estudos recentes evidenciam que os fatores de risco para a leucoplasia são coincidentes com os fatores de risco para o carcinoma epidermoide oral, sendo que o tabaco, o álcool, a radiação ultravioleta são reconhecidos como fatores etiológicos, pela comunidade científica (RAMOS et al. 2017).

Para o diagnóstico da infecção por HPV realiza-se o exame histopatológico da biópsia das lesões associado a identificação do HPV por técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Captura Híbrida ou hibridização *in situ*. No diagnóstico em lesão de cérvix uterina faz-se a detecção da proteína reguladora de ciclo celular (p16) por imuno-histoquímica combinada à detecção de DNA viral por PCR (PRIEGGE et al., 2017).

Como houve a detecção de HPV de alto risco oncogênico no carcinoma epidermoide e leucoplasia orais (RAMOS et al. 2017) discute-se inserir na rotina ambulatorial o uso dos testes para diagnóstico do HPV, havendo ainda maior prevalência viral, segundo alguns autores, em pacientes com alterações orais potencialmente malignas do que em pacientes com carcinoma epidermoide oral (CAO et al., 2016).

Apesar de existirem estudos, com a utilização da técnica de imuno-histoquímica, a respeito do perfil de expressão de proteínas de proliferação (ki67), diferenciação (citoqueratina 14 e 19 – CK14 e CK 19) e reguladoras de ciclo celular (p16, p21) em leucoplasias e carcinoma epidermoide oral, estes ainda não são conclusivos ou apresentam resultados bastante variáveis quando relacionados a presença do HPV. O estudo propôs a avaliação de marcadores celulares (CK19,

CK14, p16, p21 e Ki67) relacionando a sua expressão em associação com presença do HPV, já que estes mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos e são controversos.

Assim, nesse contexto, este estudo analisou mais refinadamente a relação entre malignidade e infecção por HPV através da detecção de DNA do vírus por métodos de biologia molecular, buscando compreender a participação viral nos fenômenos celulares que envolvem ciclo celular, proliferação e diferenciação das células, através dos marcadores analisados por imuno-histoquímica, em leucoplasias e carcinomas orais.

O objetivo do presente estudo foi associar a presença do HPV com o desenvolvimento do carcinoma epidermoide e leucoplasia na mucosa oral, com vistas a determinar métodos diagnósticos para auxiliar no prognóstico e resposta ao tratamento nos pacientes com estas lesões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Papilomavírus humano (HPV)*

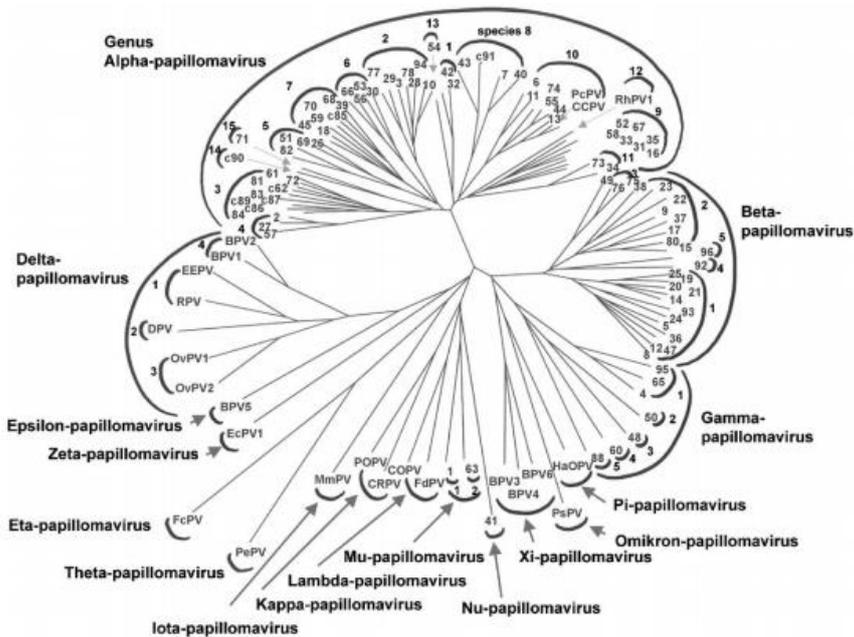
2.1.1 Estrutura Viral

O Papilomavírus humano (HPV) é um DNA vírus da família *Papillomaviridae* que apresenta DNA circular de fita dupla, são icosaédricos não envelopados, sendo que mais de 200 tipos diferentes de HPV foram identificados até o momento (GHEITH, 2019).

O vírus possui 55nm, 8000 pares de bases em seu genoma em uma única cadeia codificadora que compreende três regiões. A região regulatória – Longa de Controle (LCR- Long control region), não codificante, localizada entre os fragmentos abertos de leitura L1 (Late region 1) e E6 (Early region 6), que contém o promotor inicial e os elementos reguladores envolvidos na replicação e transcrição do DNA viral. A região precoce (Early region- E), que codifica proteínas não estruturais envolvidas na replicação do genoma viral (E1 e E2), na expressão gênica viral, replicação e na maturação das partículas virais (E4 e E5) e relacionadas à diferenciação e transformação celular (E6 e E7). A região tardia (Late region- L) codifica proteínas do capsídeo por meio dos genes L1 e L2, com base nas sequências nucleotídicas da principal proteína do capsídeo L1. Os papilomavirus foram classificados em 50 gêneros, dentre os quais apenas 5 gêneros incluem papilomavirus que infectam seres humanos (VAN DOORSLAER et al., 2018).

Os alfa, beta, gama, mu e nu são os cinco principais gêneros de *Papilomavirus humanos*, sendo que tipos virais foram identificados em cada gênero. No gênero gama foram identificados 99 tipos, compondo a maioria dos papilomavirus conhecidos, já para o gênero alfa identificados 65 tipos, beta 54 tipos e os gêneros mu apresenta 3 e nu apenas 1 tipo (DE VILLIERS, 2004) (Figura 1).

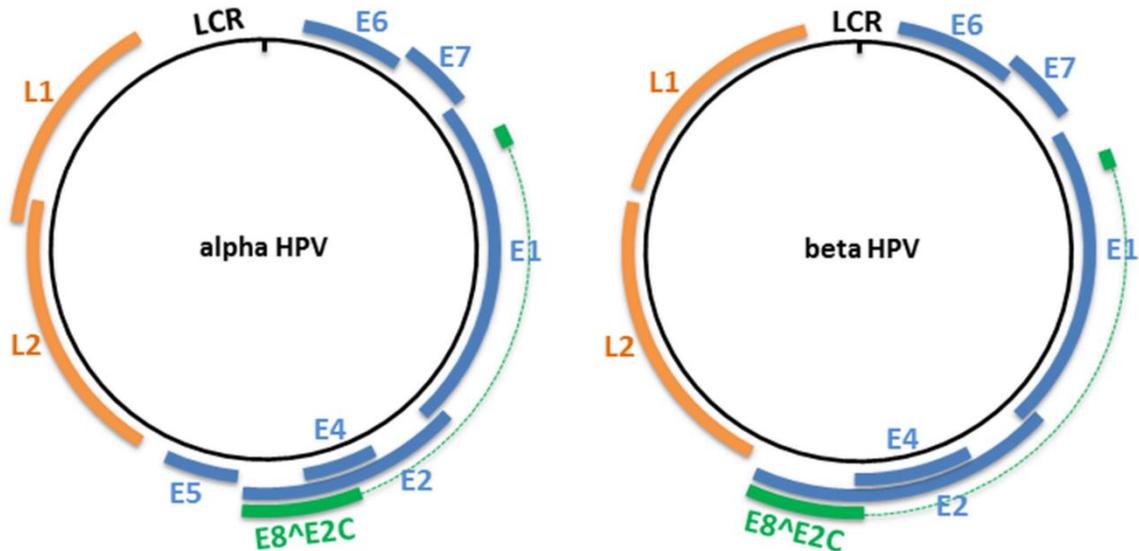
Figura 1 - Diagrama da árvore filogenética contendo a sequência de 118 tipos de Papilomavírus.



Fonte: DE VILLIERS, 2004.

Todos os HPVs do gênero alfa apresentam a organização genômica com as 3 regiões: precoce, tardia e longa de controle (Figura 2). Nem todos os tipos de HPV pertencentes aos gêneros existentes apresentam as proteínas E5 e E6, no entanto para garantir a replicação viral e disseminação do vírus, as quatro proteínas E1, E2, L1 e L2 são necessárias (GHEITH, 2019).

Figura 2 - Representação esquemática da organização do genoma dos tipos alfa e beta do HPV. O genoma de DNA circular dos tipos alfa e beta de alto risco para HPV é representado por um círculo preto.



Fonte: GHEIT, 2019.

As proteínas E6 e E7 inativam proteínas supressoras tumorais do mecanismo celular como a p53 que deixa de realizar apoptose e a pRb (proteína do retinoblastoma) que inativada causa instabilidade genômica induzindo a malignização das células. Desta forma, a interação destas proteínas virais com os supressores tumorais determinam a carcinogênese, ou seja, tem uma atuação como oncoproteína (ANTONSSON et al., 2015).

Todos os papilomavirus também têm o potencial de expressar uma proteína transcricional, E8^E2 que codifica uma proteína em que domínio E8 esta fundido aos domínios de dobradiça e de ligação ao DNA de E2 (MCBRIDE, 2013) cuja função é atuar como um repressor transcricional e reprimir a replicação dependente de E1 / E2 (AMMERMANN et al., 2008; ZOBEL; IFTNER; STUBENRAUCH, 2003).

Os gêneros beta, gama, mu e nu apresentam espécies que infectam o tecido epitelial cutâneo, o gênero alfa inclui ainda alguns tipos cutâneos de HPV como o 2, 3, 7, 10, 27, 28 e 57 que causam verrugas comuns e plantares. Os tipos cutâneos de HPV, principalmente dos gêneros beta e gama, são amplamente presentes na superfície da pele na população em geral (MUHR; EKLUND; DILLNER, 2018).

Os papilomavirus cutâneos infectam a pele mas há aqueles que infectam mucosas de seres humanos e animais, são mucosotrópicos, podendo ainda ser classificados em relação ao seu potencial carcinogênico, como de alto risco oncogênico (HIGH RISC-HR) ou baixo risco oncogênico (LOW RISC -LR), HR-HPV e LR- HPV, respectivamente (HALEC et al., 2013).

Com base em dados epidemiológicos, um subgrupo de HPV alfa foi caracterizado como tipo de HR- HPV, agentes etiológicos do câncer anogenital e um subconjunto de câncer de cabeça e pescoço (GHEITH, 2019).

2.1.2 Tipos virais e potencial oncogênico.

Os fatores envolvidos na carcinogênese estão relacionados à afinidade do HPV às células epiteliais e ao seu potencial oncogênico (MARTÍN-HERNÁN et al., 2013). O potencial oncogênico do HPV é dependente do comportamento do genoma viral na célula hospedeira. Assim, os tipos considerados de baixo risco oncogênico mantêm seu DNA em forma circular e episomal, enquanto os de alto risco oncogênico integram seu DNA ao genoma da célula hospedeira, induzindo a expressão de proteínas virais que inibem proteínas responsáveis pelo controle do ciclo celular. O desenvolvimento de neoplasias está associado à perda da regulação do ciclo celular, o que é frequentemente observado em infecções persistentes por HPV de alto risco oncogênico (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

Vários tipos de câncer, como os do colo do útero, vagina, vulva, ânus, pênis e um subconjunto de câncer de cabeça e pescoço, particularmente o câncer de orofaringe, estão associados aos tipos virais de alto risco oncogênico (HAEDICKE; IFTNER et al., 2013).

No gênero alfa, os tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 são mucosotrópicos, considerados como HR-HPV e classificados como cancerígenos pela INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC - Grupo 1) e os tipos 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 e 82, foram classificados por ter possível potencial oncogênico (Grupos 2A e 2B da IARC) (HALEC et al., 2013).

O gênero alfa também inclui HPV de baixo risco oncogênico, tipos virais causadores de lesões benignas como verrugas genitais benignas ou condiloma acuminado, é o caso do HPV 6 e 11 sendo os mais prevalentes em lesões benignas e codificam dois tipos de proteínas E5 (E5 γ e E5 δ) também os mais estudados (CASTRO et al., 2004). Cerca de 18 tipos de HPV estão relacionados ao desenvolvimento de tumores malignos no trato genital, os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 são considerados como HR-HPV para o carcinoma cervical (MUÑOZ et al., 2006).

No estabelecimento de cânceres anogenitais e orofaríngeos a incorporação do DNA do HPV, especialmente os tipos 16 e 18, expressando as proteínas virais E6 e E7 é o fenômeno considerado, pela literatura, como importante fator a impulsionar a carcinogênese (MARUR et al., 2010; SIMONATO et al., 2016). De acordo com a literatura, o HPV-16 foi identificado em mais de 90% dos carcinomas de células escamosas da orofaringe, sendo que os tipos HPV-18, 33 e 52 foram também identificados em carcinomas de células escamosas orais e orofaríngeas, mas de maneira menos frequente (KREIMER, et al., 2005). O tipo viral predominante foi o HPV-16, sendo citados em menor frequência os tipos 33 e 58 em uma revisão sistemática (VASCONCELOS et al., 2020).

Na região central do Brasil, em um estudo retrospectivo de prevalência, encontraram a distribuição HPV-16 e HPV-18 em carcinomas de cavidade oral e orofaringe, destacando a importância da vacinação para HPV no controle dos carcinomas de cavidade oral e orofaringe (PETITO et al., 2017).

A frequência de detecção do HPV em carcinomas orais varia em determinadas localidades no mundo. Baixa frequência de detecção viral foi identificada no Reino Unido (LOPES et al., 2011) e nos Estados Unidos (LINGEN et al., 2013) correspondendo a menos de 2% da população estudada e a 5,9% dos tumores analisados, respectivamente. Já na Índia, Chakrobarty et al., (2014), encontraram frequência de 46% no carcinoma epidemoide oral.

As lesões displásicas consideradas como potencialmente neoplásicas por apresentarem características histopatológicas e dados demográficos semelhantes ao carcinoma de orofaringe HPV-positivo também tem possível envolvimento viral em sua etiologia (LEE et al., 2000). Segundo Priegge et al. (2017), na grande maioria de lesões potencialmente neoplásicas que sofreram transformação pelo HPV fez-se

detecção exclusiva dos transcritos do HPV-16, mesmo assim, uma minoria de tumores de cabeça e pescoço pode estar relacionada a outros tipos virais.

A participação do HPV na patogênese do CEO em tumores dos 2/3 anteriores da língua, assoalho bucal, rebordo alveolar, gengiva, mucosa bucal e labial e palato duro, também tem sido amplamente pesquisada. No entanto, até o momento, não tendo sido estabelecida uma correlação precisa, sobretudo relacionada à ampla variação na incidência de infecção por HPV de alto risco oncogênico nestes tumores (LOPES et al., 2011; MARTÍN-HERNÁN et al., 2013). Sendo assim, apesar de diversos estudos publicados apontarem a participação do HPV na carcinogênese dos tumores da cavidade bucal, ainda há muitas controvérsias quanto ao seu envolvimento como agente etiológico destas lesões, principalmente quando se considera a grande variação na frequência de detecção do HPV.

2.1.3 Patogenia da Infecção Viral

O HPV é sexualmente transmissível, sendo frequente na região ano-genital, sua implantação oral pode ser por auto-inoculação ou pelo contato oro-sexual. As manifestações orais sabidamente associadas ao HPV são o papiloma escamoso, condiloma acuminado, verruga vulgar e hiperplasia epitelial focal (CASTRO et al., 2004). A relação do vírus com lesões neoplásicas e pré-cancerizáveis da cavidade oral permanece sob investigação.

A infecção ocorre pela penetração do vírus no epitélio, através de microfissuras na sua superfície, atingindo e infectando as células da camada basal, mas grande parte das infecções não resulta em doença clínica, pois o vírus é eliminado pelo sistema imune.

Pouco se sabe sobre o HPV e sua relação com os tecidos da cavidade oral assim a maioria dos possíveis comportamentos patogênicos do vírus é extrapolado a partir de observações na cérvix uterina.

No caso da cérvix uterina, após perda da solução de continuidade do tecido o vírus invade o epitélio e então se estabelece uma relação entre o ciclo viral e a diferenciação da célula infectada (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013). A maioria (> 90%) das mulheres sexualmente ativas adquirirá uma infecção genital pelo HPV que será resolvida pelo sistema imunológico dentro de 1 a 2 anos (MAUCORT-BOULCH et al., 2010; SCHIFFMAN et al., 2007), sendo assintomáticas. Uma minoria de

infecções por HPV se torna persistente quando associadas a outros fatores como é caso do consumo de álcool em atuação sinérgica com tipos de HR-HPV (OH et al., 2014) e o tabagismo que por si só também desempenha um papel importante nas infecções persistentes por HPV em colo uterino e na cavidade oral (HAUKIOJA et al., 2014).

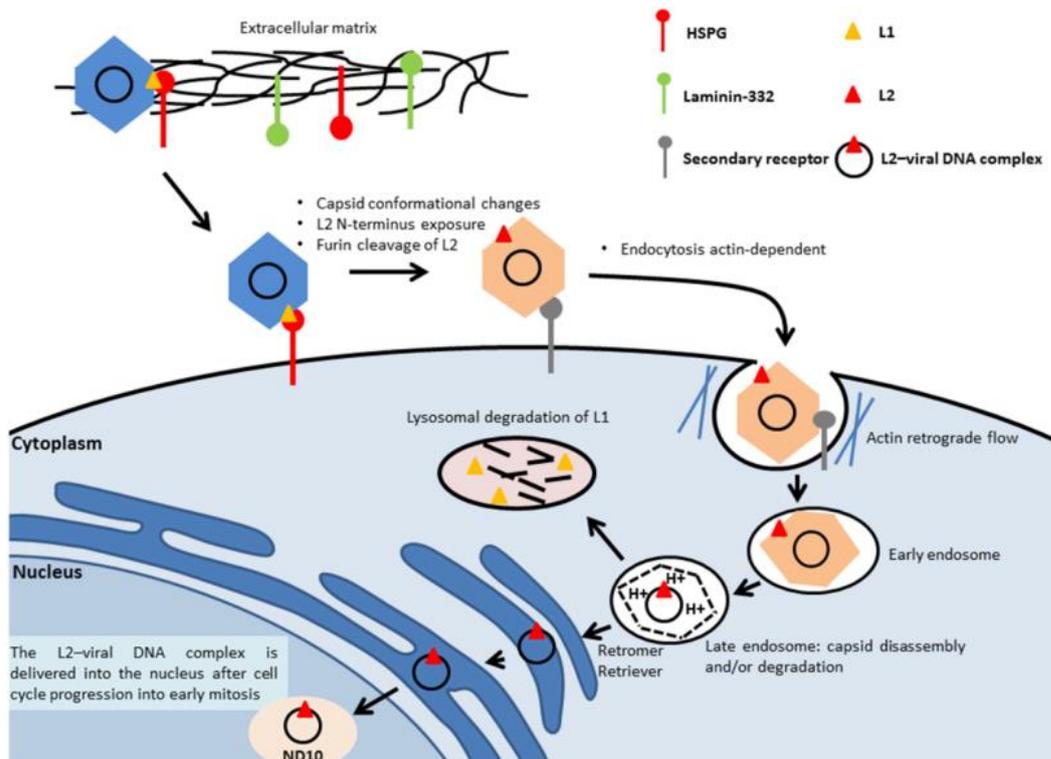
Os fatores de risco genéticos intrínsecos ao hospedeiro também podem predispor uma infecção persistente por HPV, como a alta taxa de herdabilidade do câncer de colo uterino, uma deficiência genética na resposta imune, genes do antígeno leucocitário humano (HLA) desempenham um papel fundamental na persistência de infecções e na progressão no desenvolvimento do câncer de colo uterino (CHATTOPADHYAY, 2011).

A infecção da célula pelo vírus está intimamente ligada a células basais em proliferação do epitélio em regeneração, Broniarczyk et al. (2018) mostraram que a partícula viral pode permanecer após várias semanas na superfície das células senescentes resistentes à infecção pelo HPV, mas permanece o potencial para a infecção caso o sistema imunológico não consiga frear a invasão celular pelo vírus.

Para iniciar a infecção, o vírus se liga as cadeias sulfatadas do heparan de proteoglicanos localizados na membrana da célula epitelial ou na matriz extracelular através da principal proteína do capsídeo, a L1, ocorre mudança conformacional do capsídeo e subsequente externalização da porção N-terminal da proteína L2 (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013) (Figura 3).

A clivagem de L1 no espaço extracelular pela calicreína-8 parece ser crucial para a eficiência deste mecanismo e a clivagem de L2 pela furina facilita a ligação do HPV a um receptor secundário, desconhecido, com subsequente internalização por endocitose actina-dependente (GHEIT et al., 2019).

Figura 3 - Mecanismo de entrada do HPV na célula basal epitelial para integração do DNA viral na célula hospedeira.



Fonte: GHEIT, 2019.

O complexo formado por DNA; L2 e uma porção de L1 são transportados ao Golgi em endossomos, o capsídeo viral é degradado e ocorre então a dissociação entre proteína L1 e L2, mediada por ciclofilinas das células hospedeiras. O complexo DNA; L2 é levado ao domínio nuclear (ND10) e L2 realiza a entrega do genoma viral ao ND10 (DAY et al., 2004) no núcleo da célula epitelial durante a fase inicial da mitose celular, onde ocorre a transcrição e replicação viral.

A defesa intrínseca que limita a infecção viral é realizada pelo hospedeiro, em parte, por estruturas ND10, atuando como fatores de restrição como o antígeno nuclear Sp100 que faz a repressão da transcrição, replicação e estabelecimento do DNA de HPV no estágios iniciais da infecção (STEPP; MEYERS; MCBRIDE, 2013). Proteínas celulares como a proteína 1 ligante de topoisomerase (DNA) II (Top BP1) e proteína do domínio-bromo 4 (Brd4) também estão envolvidas em limitar a amplificação do genoma viral do DNA de HPV-16 mediada por E1/E2, havendo interação de complexo repressor celular com proteínas virais E8^AE2C (DREER; VAN DE POEL; STUBENRAUCH, 2017).

O ciclo de replicação do HPV está vinculado à diferenciação do epitélio infectado. Havendo a diferenciação do epitélio estratificado, a replicação viral produtiva é iniciada com a subsequente produção de virions de progênie (DOORBAR et al., 2012). Como as células da camada basal, não infectadas, realizam sua diferenciação e interrompem o ciclo celular, o vírus desenvolve estratégias para impedir a interrupção do ciclo celular e inibir os sinais de apoptose, garantindo a amplificação do genoma viral (Figura 4).

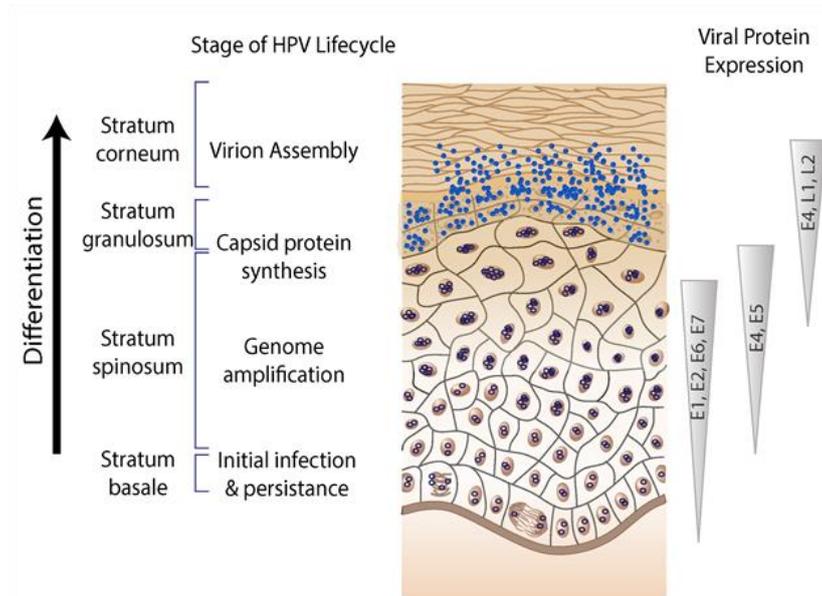
Após a integração do DNA viral de HR-HPV a expressão dos genes E6 e E7 é permanentemente aumentada, E6 liga-se e degrada a proteína tumoral intracitoplasmática p53, o que leva à inibição da apoptose e E7 se liga e degrada a proteína supressora de tumor de retinoblastoma, pRB interrompendo sua interação com o fator de transcrição E2F. A liberação e ativação do E2F resulta na expressão de genes da fase S e na progressão do ciclo celular. A regulação positiva da proteína inibidora de ciclo celular, p16, é induzida por E7 o que leva ao acúmulo celular de p16 (SYRJÄNEN, 2018). A proteína E7 do HPV-16, HPV-18 e HPV-31 apresenta os promotores dependentes da diferenciação p670, p811 e p742, respectivamente, em células epiteliais diferenciadas (RAUTAVA; SYRJÄNEN, 2011, MORGAN; MACDONALD, 2020).

A manutenção do genoma viral é facilitada pela expressão de E6 e E7 juntamente com E1 e E2, a expressão de L1 e L2 permite a montagem do vírus e a formação de virions infecciosos. As proteínas do capsídeo viral se auto-agrupam em partículas que encapsulam o DNA viral. À medida que as células se desprendem para o ambiente, são liberados virions infecciosos completando o ciclo de vida viral (Figura 4).

Através de uma infinidade de interações proteína-proteína, as proteínas virais E6 e E7 usurpam o ambiente celular, permitindo a replicação viral em células diferenciadas (BRIMER; DREWS; VANDE POL, 2017; MEYERS et al., 2017). A expressão das oncoproteínas é mantida sob o rígido controle de E2, havendo a perda de suas funções repressivas ocasiona altos índices de expressão de E6 e E7, evento-chave na transformação celular ocasionada pelo HPV. Além de regular a replicação, a proteína E2 viral desempenha um papel fundamental durante a manutenção do ciclo de vida viral que pode durar meses a anos, garantindo que os genomas virais sejam fielmente particionados nas células filhas e nas camadas superiores dos epitélios diferenciados, resulta que o DNA viral é amplificado em um número alto de cópias

(VAN DOORSLAER et al., 2018). A fase vegetativa do ciclo de vida viral requer a resposta de dano ao DNA celular (BRISTOL; DAS; MORGAN, 2017).

Figura 4 – Organização do Ciclo de vida viral do HPV.



Fonte: VAN DOORSLAER et al., 2018

Além das oncoproteínas E6 e E7, os HR-HPV codificam E5, que também parece desempenhar um papel na carcinogênese induzida pelo HPV, pois aumenta os efeitos de immortalização celular do HPV-16, promove a motilidade das células tumorais e metástases, promove a progressão do ciclo celular e inibição de apoptose (RAUTAVA; SYRJÄNEN, 2011). O nível de outro inibidor de ciclo celular, a proteína p21, é reduzido em células infectadas que superexpressam E5 (LIAO et al., 2013), sua atividade, é portanto, crítica para manter a sinalização mitogênica e retardar a expressão do marcador de diferenciação durante as etapas produtivas do ciclo de vida do HPV-18.

Vários tipos de HPV aumentam significativamente o promotor da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT), que faz catalise da telomerase. O telômero é uma sequência repetitiva de DNA com ligação na porção final de cada cromossomo e sua principal função é proteger o DNA de deterioração, podendo restringir a longevidade das células por ser encurtado a cada replicação celular, sem o telômero, as células sofrem apoptose. A hTERT desempenha um papel importante durante

carcinogênese cervical pois aumentam com o grau de as lesões cervicais (BRANCA et al., 2006).

Um estudo recente mostrou que a metilação do gene L1 aumenta significativamente de acordo com o grau da lesão cervical e uma alta taxa de metilação desse gene está correlacionada ao status de integração do HPV (TORRES-ROJAS et al., 2018). Os dados sobre a integração do HPV no câncer de cabeça e pescoço ainda são escassos e contraditórios, segundo a literatura, formas episomais, integrativas e mistas de HPV são encontradas nestes tipos de câncer. Formas integrativas surgem em 39% dos carcinomas espinocelulares e 43% de câncer de cabeça e pescoço, percentual mais baixo se comparado com o câncer cervical positivo para HPV (PARFENOV et al., 2014).

Embora existam vários estudos acerca do comportamento viral nas lesões cervicais, a patogênese viral na cavidade oral é pouco estudada necessitando de maiores investigação, além de que os resultados de estudos de frequência de HPV nestas lesões, encontrados na literatura, são discrepantes. Isto pode ser explicado pelo emprego de diferentes metodologias e técnicas na detecção de HPV, assim como por diferenças étnicas e geográficas que certamente influenciam o processo de carcinogênese (VASCONCELOS et al., 2020).

2.1.4 Métodos para detecção do HPV.

Vários métodos são utilizados na rotina para o diagnóstico viral, dentre eles a detecção de alterações celulares patognomônicas (citopáticas) causada pelo vírus no exame histopatológico e detecção de proteínas virais ou ácidos nucleicos nas amostras ou anticorpos no soro (ANDERSON et al., 2017; KOSS,1990; GULTEKIN et al., 2015; MOOREN et al. 2014SINGH; WESDRA, 2010).

Por muito tempo, o exame histopatológico foi praticamente o único método utilizado para identificar o HPV em biópsias. Na microscopia, as alterações celulares citopáticas causadas por HPV incluem coilocitose, multinucleação, disqueratose e paraqueratose, e estes parâmetros são considerados confiáveis em biópsias retiradas do colo uterino (KOSS,1990). Em biópsias da mucosa oral, células epiteliais vacuolizadas são frequentes e associadas à irritação mecânica e isso pode obscurecer a identificação de coilócitos verdadeiros (KELLOKOSKI et al., 1990).

A presença de HPV também pode ser detectada, na microscopia de rotina, através da detecção de antígenos virais ou ácidos nucleicos, como a identificação da proteína L1 por imuno-histoquímica, no entanto, a detecção de L1 é confiável apenas em infecções produtivas ou vegetativas e a grande variedade de genótipos torna-se um entrave para este tipo de teste (SYRJANEN, 2018).

Atualmente, a infecção pelo HPV pode ser identificada de forma confiável somente detectando o DNA ou RNA viral nas amostras por biologia molecular (GIBSON, 2014). Métodos moleculares amplificam alvos como DNA ou RNA mensageiro (mRNA), como nas técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase, as quais utilizam primers consenso ou tipo-específicos e métodos que amplificam sinais do DNA, que incluem técnicas de hibridização, como Captura Híbrida e hibridização *in situ* (SINGH; WESDRA, 2010).

A Captura Híbrida permite quantificar a carga viral, no entanto, não permite identificar o tipo viral específico e a PCR tem sido utilizada já que transpõe esta limitação. Os primers utilizados na PCR são direcionados para a região altamente conservada do gene L1, sendo mais eficiente na detecção do DNA de HPV quando comparada à técnica de hibridização (GRAVITT et al., 2000).

Os métodos de hibridação *in situ* são específicos porque os sinais positivos para o HPV podem ser localizados nos tecidos sendo que a morfologia é visualizada simultaneamente. Esse método permite a visualização direta do vírus nas células tumorais e minimiza o risco de um resultado de teste falso positivo que pode resultar da contaminação do tecido com DNA viral (PRIEGGE et al., 2017). Na rotina de diagnóstico não há indicações para a triagem de infecções por HPV orais assintomáticas. No entanto, se a amostra mostra quaisquer alterações morfológicas sugestivas de HPV, deve-se confirmar por hibridização a presença de HR-HPV, especificamente o HPV-16, usada por muitos autores para detectar o DNA do HPV em cânceres de cabeça e pescoço (SYRJANEN, 2018).

A proteína envolvida no controle do ciclo celular, p16, é considerada como um marcador na imuno-histoquímica com valor preditivo para infecção por HPV. A concordância entre a expressão de p16 e detecção de DNA do HPV apresenta maior correlação no câncer tonsilar seguido por câncer de língua (SYRJANEN, 2018). Contudo, para alguns autores a expressão de p16 por si só, não é confiável para

estimar a positividade do HPV em amostras orais, já que foi demonstrado que usando positividade para p16 como preditiva para HPV resultaria em aproximadamente 20% dos casos de tumores de cabeça e pescoço seriam falsos positivos para HPV (GULTEKIN et al., 2015; MOOREN et al. 2014).

Assim, para a utilização de métodos imuno-histoquímicos caso outros métodos não estiverem disponíveis, sugere-se a detecção simultânea dos marcadores p53 que deve ser negativo, ciclina D1 que deve ser altamente expresso, p16 com resultado positivo e pRb com resultado negativo, para determinar a infecção pelo HPV (SYRJANEN, 2018).

A sorologia para anticorpos E6 e E7 do HPV-16 pode prever câncer de orofaringe, mesmo com 5 a 10 anos de antecedência, a soropositividade do HPV-16 conferiu um risco aumentado em mais de 14 vezes para subsequentes desenvolvimento de câncer de orofaringe (ANDERSON et al., 2017) e a sensibilidade e especificidade de anticorpos contra a proteína E6 do HPV-16 foram excepcionalmente altos na previsão de câncer de orofaringe. Anticorpos para HPV também são detectados na saliva, mas seu valor no diagnóstico oral de HPV não está estabelecido, estudos recentes demonstraram que os níveis de IgG nos soros e nos fluidos orais, direcionados a E7 do HPV-16, tem correlação estatística com a infecção viral e deve ser explorado por sua capacidade de previsão ou risco de recorrência da infecção (HANNA et al., 2017).

Segundo Priegge et al., 2017, do ponto de vista biológico, a detecção de transcritos de oncogene do HPV constitui o atual padrão ouro para identificar um papel etiológico do HPV nos cânceres de cabeça e pescoço com alta sensibilidade (98%) de detecção de DNA do HPV por PCR em lesões potencialmente neoplásicas que sofreram transformação pelo HPV. No entanto, em uma metanálise, demonstram que a especificidade do PCR quando usado como teste único é menor do que o PCR em associação com a imuno-histoquímica para p16 INK4a, que juntos, apresentaram alta sensibilidade e alta especificidade na detecção do HPV, o PCR provou ser um teste complementar valioso na infecção pelo vírus. Não recomendaram o uso exclusivo da hibridização *in situ* para detectar uma infecção por HPV em lesão potencialmente neoplásica em transformação, uma vez que sua sensibilidade é baixa quando usada

como teste único e mesmo em combinação com imuno-histoquímica poderia diminuir ainda mais.

A positividade do HPV por biologia molecular demonstra a presença do vírus mas não traz informações sobre o status da infecção ou seus resultados ao longo do tempo. Assim a utilização de métodos histológicos com avaliação morfológica associados à detecção viral e a identificação de marcadores relacionados ao metabolismo celular podem de forma combinada esclarecer sobre a lesão e identificar pacientes em risco de pré-cânceres de HPV ou malignidades na região da cabeça e pescoço.

2.2 Leucoplasia Oral

A leucoplasia oral possui características clínicas que a definem como uma placa branca aderente à mucosa que não pode ser removida por raspagem, não está vinculada a um diagnóstico anatomopatológico específico. É tipicamente considerada como uma lesão que pode vir a sofrer transformação maligna, cuja frequência dessa transformação é maior do que o risco associado a uma mucosa normal. Microscopicamente, a leucoplasia oral pode ou não apresentar uma displasia ou até mesmo um carcinoma (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016).

A relação entre o aspecto clínico e as características histopatológicas das leucoplasias orais foram avaliadas por Rodrigues et al. (2000) em pacientes adultos que apresentaram lesões leucoplásicas na mucosa oral. As lesões foram classificadas segundo suas características histopatológicas em seis grupos: hiperqueratose com ausência de displasia epitelial; displasia epitelial discreta; displasia epitelial moderada; displasia epitelial severa, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo.

Fatores de risco para a leucoplasia oral são os mesmos que estão envolvidos no desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral (CEO), como uso de tabaco, consumo de bebida alcoólica, sexo, idade, exposição a radiação ultravioleta, o que torna evidente para a literatura a associação entre estas lesões (RAMOS et al., 2017).

É a lesão oral potencialmente maligna mais comum que ocorre na cavidade oral, com uma prevalência global variando de 0,5% a 3,46% (GISSI et al., 2018). Quando ocorre o desenvolvimento de uma neoplasia a partir de uma leucoplasia, o

diagnóstico mais frequente é de carcinoma epidermoide (MAIA et al., 2016), que sendo diagnosticado precocemente pode melhorar a sobrevida do paciente e reduzir significativamente as altas taxas de mortalidade. Warnakulasuriya e Ariyawardana (2016) relataram uma taxa média de transformação maligna para população total de seu estudo de 3,5%, com uma ampla faixa compreendida entre 0,13% e 34,0%.

Acredita-se se que a maioria, se não todos, os CEOs são precedidos por um período durante o qual o epitélio afetado mostra evidência de displasia epitelial (NAPIER; SPEIGHT, 2008) e sob efeito sinérgico com fatores de risco, dentre os mais importantes o tabaco e o álcool, progridem para a lesão neoplásica (RAMOS et al., 2017).

De acordo com a literatura, o risco de transformação maligna de uma leucoplasia oral está relacionado às suas características clínicas e locais. Além da localização da lesão, estão a idade avançada, sexo feminino, região geográfica do mundo, lesão superior a 200 mm², tipo não homogêneo de leucoplasia e os graus mais altos de displasia (PINTO et al., 2020).

As leucoplasias com aspecto macroscópico não homogêneo apresentam um risco maior de transformação maligna (HOLMSTRUP et al., 2006; SUNDBERG et al, 2019; VAN DER WAAL, 2009).

Quanto a localização da lesão, a leucoplasia na língua tem um risco 2,72 vezes maior para transformação maligna e no assoalho da boca o risco é 1,84 vezes maior quando comparados com outras localizações na cavidade oral (LEE et al., 2006). A prevalência de transformação maligna também foi maior na leucoplasia de língua (PINTO et al., 2020) variando de 24,22% em amostras de língua a 14,85% em amostras de língua que se estendiam ao assoalho da boca (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016).

A prevalência de leucoplasia oral aumenta em homens especialmente com idade mais avançada (FARENZENA et al., 2012; NEVILLE et al., 2009; PARLATESCU et al. 2014,). Em contrapartida, sem uma razão clara que estabeleça o fato, os homens com leucoplasia oral apresentam menores chances de sofrer transformação neoplásica (GISSI et al, 2018). A maior prevalência de transformação maligna associada a pacientes idosos pode sugerir que estes pacientes apresentam uma lesão cancerizável em exposição a outros fatores de risco por longos períodos, ficando assim mais propensos à transformação maligna (AMAGASA; YAMASHIRO; ISHIKAWA, 2012; SOBRAL et al., 2014).

Ramos et al. (2017) ressaltam a importância do reconhecimento e diagnóstico precoce da leucoplasia oral dentro das desordens potencialmente malignas pela relevância quanto ao seu potencial de malignização (PARLATESCU et al., 2014) e pelo fato de que o CEO tem alta taxa de mortalidade em estágios avançados da doença.

Sabe-se que os fenômenos celulares relacionados ao desenvolvimento da leucoplasias e sua transformação neoplásica originam-se de alterações em nível nuclear que comprometem o ciclo das células epiteliais e sua capacidade proliferativa, bem como os graus de diferenciação destas células na cavidade oral. Desta maneira, agentes etiológicos que afetam diretamente o ciclo das células epiteliais são caracterizados como potenciais agentes carcinogênicos nas leucoplasias. Há, no entanto, na literatura, controvérsias quando se considera o HPV como fator determinante a desencadear estas alterações celulares e a relação entre tipos específicos de HPV com eventos celulares como proliferação e diferenciação celular.

A prevalência de HPV pode ser maior em pacientes com alterações orais potencialmente malignas como a leucoplasia quando comparado ao CEO (CAO et al. (2016), assim existe a discussão se o teste de detecção do HPV deveria ser realizado como rotina em pacientes com diagnóstico de leucoplasia, ressaltando o envolvimento do HPV nas lesões pré-cancerígenas. A frequência de detecção de tipos de HPV de alto risco oncogênico nas leucoplasias pode variar de 9,1% a 91% quando utilizado o método de Hibridização *in situ* (MC CORD et al., 2013; CALEY et al., 2015; LERMAN et al., 2017; SUNDBERG et al., 2019).

Foi demonstrado que as frequências de HPV foram mais baixas mesmo entre as leucoplasias ao levar em conta o grau de displasia da lesão, especialmente naquelas leucoplasias que apresentam o grau menor de displasia ou as que não apresentavam displasia (VASCONCELOS et al, 2020).

Para prever o risco de transformação maligna de uma lesão, pode-se lançar mão da análise imuno-histoquímica como um método simples e barato na determinação de marcadores úteis. Wagner et al. (2016) demonstraram que a expressão do marcador de proliferação celular, Ki67, aumentou significativamente na leucoplasia que sofria transformação para CEO em relação a mucosa normal e em 30 casos estudados de leucoplasia oral com displasia. Kumar et al. (2010) encontraram uma expressão aumentada dos marcadores p53 e Ki67 relacionada ao grau de

displasia, sugerindo que a co-expressão desses biomarcadores pode ser usada para identificar lesões com alto risco de transformação neoplásica.

2.3 Carcinoma Epidermoide Oral (CEO)

O desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral envolve múltiplas alterações genéticas que se acumulam progressivamente durante um período prolongado, cujo efeito geral ultrapassa a capacidade de reparação inerente a célula (FARAH et al., 2014).

Esta neoplasia é multifatorial em sua etiologia, fatores internos e externos somam-se para gerar um fenótipo maligno. Os fatores externos incluem o tabagismo e o consumo excessivo de álcool, sendo que o risco é 30 vezes maior para os indivíduos que fumam e bebem quando se compara a indivíduos que não fazem uso do tabaco e álcool (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2019).

Pode-se ainda relacionar como fatores externos, a exposição ao sol que apresenta importante risco para o câncer de lábio, o excesso de gordura corporal, a infecção pelo HPV associada ao câncer de orofaringe (MORO et al. 2018) e fatores de exposição ocupacional (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2019).

A incidência global de câncer na cavidade oral é estimada em 4 casos por 100.000 pessoas, havendo uma grande variação em todo o mundo a depender da localidade de nenhum caso registrado a 20 casos por 100.000 pessoas. Em alguns países do Pacífico Asiático, o câncer oral está entre os três principais tipos de câncer. Na América do Norte e na Europa, as infecções por papilomavírus humano são responsáveis por uma porcentagem crescente de cânceres orais entre os jovens (WHO, 2020).

A incidência varia em áreas do mundo de 64,2% no centro-sul e leste da Ásia 17,4% na região central e Europa Oriental, 7,6% na América do Norte, o câncer oral é o mais comum na Índia entre homens e a quinto mais comum em mulheres. Por outro lado, América Latina e Caribe, África e Oceania apresentam baixa incidência. A mortalidade por câncer bucal é de 73,3% na Ásia e 13,6% na Europa. Sua alta taxa de mortalidade depende do estágio da doença quando diagnosticado que em muitos

casos já está avançado. Em 2020, o câncer oral foi o décimo sexto câncer e décima quinta causa de morte em todo o mundo (SANTACROSE et al., 2021).

De acordo com o INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA), 2020, para o Brasil, estimou-se 11.180 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e de 4.010 em mulheres para cada ano do triênio 2020-2022. Sem considerar os tumores de pele, na região centro-oeste do Brasil, o câncer da cavidade oral é o quinto mais frequente em homens e o 13º mais frequente em mulheres com um risco estimado de 10,69 casos novos a cada 100 mil homens e de 3,71 para cada 100 mil mulheres.

O câncer de cabeça e pescoço, incluindo o câncer de boca, é o sexto câncer mais comum em seres humanos em todo o mundo. O CEO é considerado o mais frequente na cavidade bucal, representando mais de 95% dos casos (GUPTA; METGUD, 2013; MORO et al, 2018; PERES et al., 2019).

O câncer envolve um acúmulo de danos genéticos não letais a célula podendo ser adquiridos quando ocasionados por fatores externos ambientais ou fatores intrínsecos como mutação genética herdada em linhagens celulares germinativas. Existem quatro grandes classes de genes envolvidos na carcinogênese: os proto-oncogenes (fatores de crescimento e seus receptores, proteínas envolvidas com a transdução de sinais, fatores de transcrição e reguladores do ciclo celular), os genes supressores tumorais, gene responsável pela apoptose e gene associado ao reparo do DNA (CHOI ; MYERS, 2008; KUMAR et al., 2010).

Após estímulo agressor, proto-oncogenes passam a atuar como oncogenes que nas células normais são inativos ou são expressos em baixas quantidades, resulta que as células cancerígenas se tornam autônomas e proliferativas. Dentre os principais oncogenes relacionados à carcinogênese oral os mais estudados são os gene do linfoma 2 de células B (bcl-2), gene que codifica ciclina D (CCND), receptor tirosina quinase humana 2 (ERBB2), genes da família do fator de crescimento do fibroblasto 3 (FGF3), gene proteína humana do Sarcoma vírus do rato (HRAS) e gene da mielocitomatose (myc) (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2005).

No CEO o fator de crescimento (TGF- α), fator de crescimento epidérmico (EGF) e receptores de crescimento epidérmico (EGFR) estão associados a um pior prognóstico e regulam de forma anormal, o ciclo celular com aumento na proliferação celular (EZE; LO; BURTNES, 2017). Com o aumento da expressão do EGFR e seus

ligantes ocorre ativação de muitas vias de transdução de sinal, tais como: Ras/Raf/MEK/MAPK4 (proteína quinase ativada por mitógeno), as quais têm funções importantes no crescimento, metabolismo, sobrevivência e divisão celular, PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase), STAT (transdutor de sinal e ativador da transcrição) e vias de proteína quinase C (PKC), dentre outras (CHOI e MYERS, 2008).

A inativação de genes supressores de tumor, através de mutações pontuais, amplificações, rearranjos, deleções e a ativação de oncogenes por amplificação estrutural, amplificação gênica, rearranjo cromossômico ou infecção viral, são fenômenos biológicos fundamentais na transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica (KUMAR et al., 2010).

Mesmo em menor número, os genes supressores tumorais atuam na carcinogênese de forma significativa, na infecção viral há relação dos supressores pRb e da p53 com a transformação neoplásica uma vez que as proteínas virais oncogênicas tem a capacidade de ligar-se e neutralizar suas atividades inibidoras. A perda da função da p53 ocorre em mais de 90% dos CEO de cabeça e pescoço (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2005).

Para impedir a proliferação celular cujo DNA foi danificado e promover a reparação do DNA, pontos de verificação irão realizar esta ação em cada etapa do ciclo celular. Genes promovem a apoptose quando não há possibilidade de reparação, no entanto, se houver mutações em genes supressores resultará em transformação maligna. No CEO, pRb, p53, gene p21 e gene p16 estão entre os genes supressores tumorais que sofrem mutação (CHOI; MYERS, 2008; KUMAR et al., 2010).

Células cancerígenas podem apresentar um mecanismo de escape quanto ao efeito protetor do telômero, produzindo a enzima telomerase, estabilizando o comprimento do telômero e resultando na imortalização das células cancerosas. (SRITIPPHO; CHOTJUMLONG; IAMAROON, 2015). Segundo a literatura 80 a 90% dos carcinomas de cabeça e pescoço, incluindo o CEO, foram positivos para a atividade da telomerase, que se correlacionou com os graus de diferenciação tumoral e estágios do quadro clínico do CEO (SUMIDA; HAMAKAWA, 2001).

O desenvolvimento do câncer apresenta em sua primeira fase, de iniciação, em que o DNA da célula é danificado por agentes injuriantes produzindo mutações

genéticas na “célula iniciada” (DEVI, 2004) com alterações fenotípicas muito pequenas ou inexistentes.

A célula iniciada quando ativada por substâncias como o álcool, por exemplo, levando a proliferação celular e crescimento tecidual entram em fase de promoção (VINCENT; GATENBY, 2008). Quando muitas células se encontram em fase de promoção e na fase seguinte, fase de progressão, o crescimento excessivo de tecido sofre a ação de limites anatômicos como falta de espaço, nutrientes e hipóxia (SRITIPPHO; CHOTJUMLONG; IAMAROON, 2015). A partir daí, as células malignas invadem o tecido normal e tem capacidade por fenômeno de metástase de se deslocar para outros sistemas ocasionando sintomas clínicos e condições de risco à vida dos pacientes.

Histologicamente, o CEO é caracterizado por invasão, em ninhos, por células malignas do epitélio que podem produzir queratina e formar pérolas de queratina (KRISANAPRAKORNKIT; IAMAROON, 2012). As células tumorais são mais invasivas à medida que o CEO progride podendo destruir estruturas circundantes como músculo, osso e após metástase originar um tumor em um órgão secundário em outro sistema.

A classificação histológica do CEO pode ser usada como preditiva ao prognóstico dos pacientes. Quanto ao grau de diferenciação celular, classifica-se como tumor bem diferenciado cujas células são maduras o suficiente para se parecer com o epitélio normal, a produção de queratina é frequentemente mantida e apresenta pérolas de queratina. Pode apresentar-se como um tumor moderadamente diferenciado com menor produção de queratina, células malignas menos diferenciadas, presença de pleomorfismo nuclear e figuras de mitoses anormais. Um tumor pouco diferenciado tem células epiteliais predominantemente imaturas, mitoses anormais numerosas, sem produção de queratina ou produção escassa (SRITIPPHO; CHOTJUMLONG; IAMAROON, 2015).

A classificação histopatológica tem correlação com outros parâmetros prognósticos como o envolvimento linfonodal, metástases para tecido nervoso ou outros órgãos e recorrências após o tratamento. A classificação com menor diferenciação celular está associada a invasão linfonodal regional, disseminação extracapsular, invasão perineural (FANG et al., 2009; LARSEN et al., 2009).

O carcinoma epidermoide de boca está associado diretamente com o excesso do consumo de tabaco e álcool (SIMONATO et al., 2016), podendo atuar no processo de carcinogênese pois a exposição das células do trato digestivo a substâncias liberadas pela fumaça do tabaco pode ser crucial no processo de carcinogênese e imunossupressão. O consumo abusivo de álcool pode atuar de forma sinérgica com o fumo, potencializando seu efeito e/ou também alterando a estrutura da mucosa oral, deixando-a mais permeável aos agentes carcinogênicos (OH et al., 2014).

Aproximadamente 15 a 20% de pacientes com CEO na população ocidental não apresentam fatores de risco convencionais e estão relacionados à genótipos de HPV alto risco (BIXOFIS et al., 2014) e o perfil de pacientes com CEO relacionados ao HPV é de pacientes mais jovens, especialmente em homens brancos com comportamento sexual apresentando múltiplos parceiros. Na população asiática a incidência de CEO relacionada ao HPV parece ser significativamente maior (ZHU; SCHUERCH; HUNT, 2015)

Os casos de câncer de orofaringe associados ao HPV são mais observados à medida que os originados pelo tabagismo diminuem, havendo no Brasil uma redução no tabagismo que passou de 35% da população nos anos 1980, para 15% da população (MINISTERIO DA SAÚDE, 2014). O fenômeno observado é a diminuição do tabagismo como causa de câncer de orofaringe, e, por sua vez, o crescimento dos tumores nessa região diretamente relacionados com a infecção pelo HPV, havendo aumento na incidência de tumores em indivíduos mais jovens, principalmente por HPV tipo 16, que é também muito frequente em tumores do colo do útero.

Carcinomas epidermoides HPV-positivos apresentam um comportamento menos agressivo em comparação aos tumores HPV-negativos, devido à particularidade de suas características moleculares e morfológicas, conferindo a esses tumores um bom prognóstico, uma melhor resposta aos tratamentos quimio e radioterápicos, diminuição significativa do risco de morte com redução de 40 a 60% e redução da recidiva em torno de 60 a 70% (EZE; LO; BURTNES, 2017).

O comportamento característico dos tumores HPV-positivos tem estimulado a pesquisa de imunomarcadores que contribuam de forma prática na rotina anátomo-patológica, identificando as lesões relacionadas ao vírus (LAJER; VON BUCHWALD, 2010).

2.4 Proteínas envolvidas na Proliferação e Ciclo Celular

2.4.1 Proteína reguladora de ciclo celular - p16

A regulação do ciclo celular é realizada por uma série de proteínas para que os eventos celulares como duplicação, separação cromossômica e de reparo de DNA ocorram de forma ordenada. Essas proteínas, denominadas de quinases ciclina-dependentes (CDKs), nas formas ativas formam complexos com proteínas específicas denominadas ciclinas (ALBERTS, et al., 2002).

O complexo formado por CDK/ciclina através da fosforilação de proteínas regula eventos do ciclo celular. A proteína do retinoblastoma (pRb), por exemplo, que no estado ativado se encontra hipofosforilada, pode ser fosforilada pelo complexo CDK/ciclina ocasionando progressão do ciclo celular (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012; OGUEJIOFOR et al., 2013; PANNONE et al., 2012). A quantidade das ciclinas varia durante o ciclo celular, de acordo com as necessidades celulares são sintetizadas em fases específicas do ciclo e degradadas após utilização. (ALBERTS, et al., 2002).

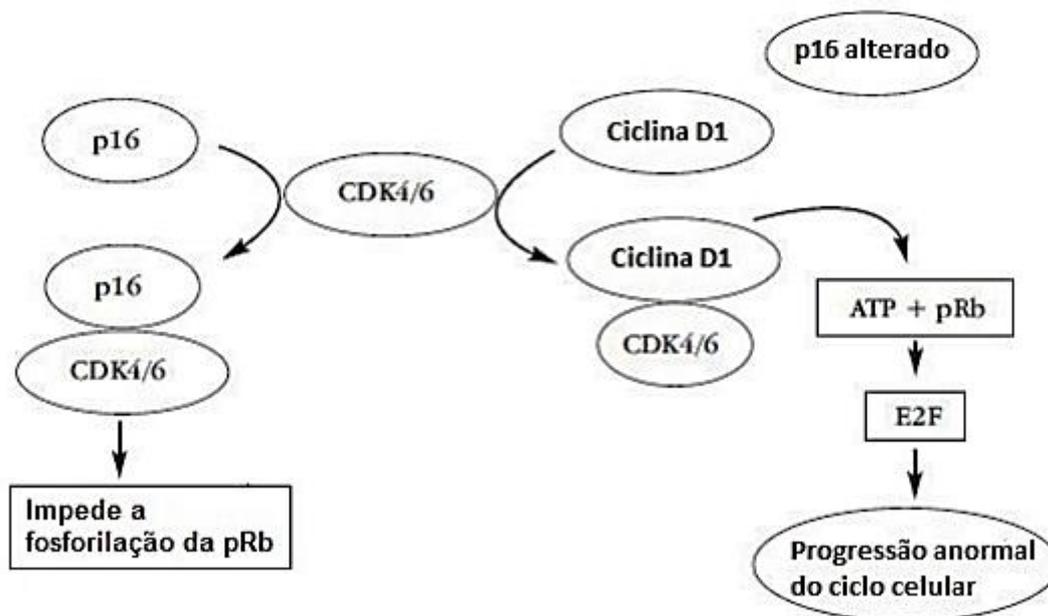
A regulação da formação do complexo CDK-ciclina é realizada por inibidores de quinases ciclina-dependentes (CKIs), que através do bloqueio, promovem a parada do ciclo celular. Existem duas classes principais de inibidores: as famílias Cip (proteínas interação com CDK) /Kip (inibidor de Kinase) e INK-4/ARF. Dentro da família Cip/Kip destacam-se p21, p27 e p53 e, pertencentes à família INK-4/ARF, p16 e p14, assim estes inibidores funcionam como supressores tumorais e tem sua expressão modificada em tumores (DIAS, 2005).

O gene P16INK4a codifica a proteína 16 (p16) que atua como um CKI, regulando negativamente a progressão do ciclo celular uma vez que bloqueia a fosforilação da pRB. O ciclo celular sofre uma parada no final da fase G1 através da formação de complexos com proteínas CDK (WITKIEWICZ et al., 2011).

A pRB exerce efeitos antiproliferativos por meio do controle da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular, os fatores de transcrição E2F regulam a transcrição de muitos genes, a ciclina D forma um complexo com CDK4/6 que promove progressão da fase G1 para S do ciclo celular, resultando na fosforilação de pRb (EZE 2017). Em sua forma ativa, hipofosforilada, a pRB mantém a célula na fase G1,

enquanto, quando fosforilada, a pRB torna-se inativa e libera o fator E2F que induz a progressão do ciclo celular para a fase S. A p16 impede a fosforilação da pRb quando forma um complexo com CDK4 e CDK6, resultando na inativação do fator E2F componente que atua na progressão do ciclo celular (OGUEJIOFOR et al., 2013; PANNONE et al., 2012) (Figura 5).

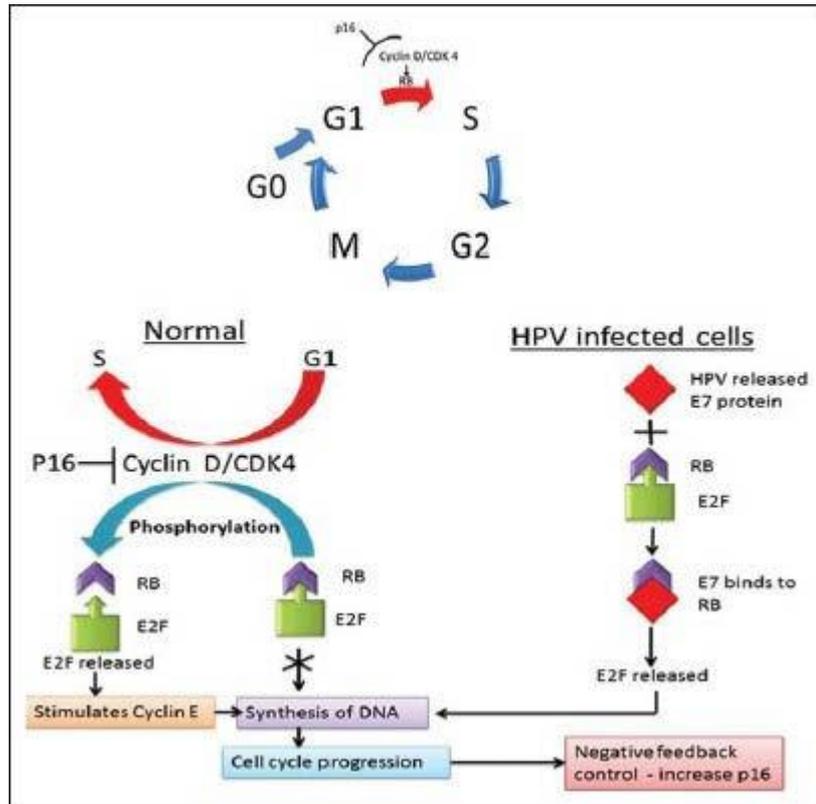
Figura 5 - Representação esquemática da atuação de p16 na regulação do ciclo celular.



Fonte: traduzido de VIEIRA, 2012.

Na infecção pelo HPV, o vírus promove uma rápida degradação de pRb através da oncoproteína E7 pois esta compete com o E2F para se ligar ao pRb, complexos E2F-Rb não são formados e compromete a regulação da transcrição e tradução de p16, havendo o aumento da expressão de p16 (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012) (Figura 6).

Figura 6 - Mecanismo de ciclo celular normal e em células infectadas por HPV.



Fonte: PATIL et al., 2014.

Pacientes com carcinoma de orofaringe e da cavidade oral, positivos para p16, apresentam melhores resultados na terapia para o controle do tumor e melhor sobrevida do paciente na presença ou ausência da doença, quando comparados com pacientes com carcinoma negativos para p16 (SRITIPPHO; CHOTJUMLONG; IAMAROON, 2015 ; ZHU; SCHUERCH; HUNT, 2015).

Nestes tumores, há uma frequência elevada de detecção do HPV e uma alta correlação da superexpressão de p16 com índices de 98% (ZHU; SCHUERCH; HUNT, 2015) e de 93% (SINGHI e WESTRA, 2010) em carcinoma de cabeça e pescoço, com uma alta taxa de correlação entre o HPV-16 e p16.

A marcação com p16 apresenta 100% de sensibilidade em casos de CEO relacionados ao HPV. Por outro lado, apresenta uma taxa de especificidade menor podendo-se ter até 26% de resultados falso-positivos (PANNONE et al., 2012).

No câncer de cabeça e pescoço, especialmente na orofaringe, a p16 tem sua expressão aumentada em altos níveis em células infectadas por HR-HPV, tais como os tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70, transformando esta

proteína em um marcador com valor preditivo para infecção por HPV (SRITIPPHO; CHOTJUMLONG; IAMAROON, 2015). Em câncer positivo para HPV a expressão de p16 fica aumentada e frequentemente perde expressão em tumores negativos para HPV (EZE; LO; BURTNES, 2017).

Alguns estudos concluíram que a expressão de p16 não é um indicador determinante da presença de HPV nas amostras de CEO estudadas, considerando que um maior número de casos deveria ser investigado na população estudada, para avaliar sua aplicabilidade como marcador de prognóstico (ABREU., 2015, SUNDBERG et al., 2019). Há ainda a possibilidade de a expressão aumentada da proteína p16 estar envolvida com outros fatores de risco não relacionados ao HPV como ocorrência de distúrbios na via do retinoblastoma como a inativação mutacional da pRB (MARUR et al., 2010).

A literatura apresenta uma discussão acerca da utilização de métodos combinados e auxiliares em diagnóstico de tumores HPV-positivos já que a utilização única da técnica de IHQ para p16 traz resultados questionáveis.

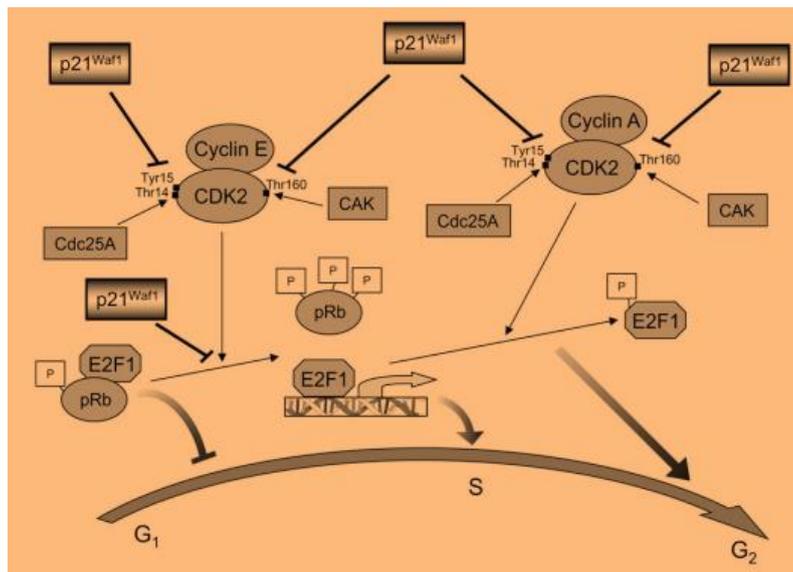
Permanece inconclusivo o valor da utilização da IHQ para detecção de p16 como método de triagem para detecção de HPV em relação à sensibilidade e especificidade do teste quando utilizado sem subsequente detecção molecular do DNA viral (MANDÚ et al., 2015). Sendo assim, apesar da IHQ em tecido fixado e incluído em parafina tenha grande aplicação clínica e utilização na rotina diagnóstica, a identificação molecular do vírus em casos onde é observado um acúmulo p16 no tecido tumoral deve ser realizada como método adicional (SCHACHE et al., 2011).

A associação de testes de IHQ para p16 e PCR para DNA de HPV foi tão sensível quanto o uso da IHQ ou PCR isoladamente, mas significativamente mais específico que a utilização dos testes em separado. De forma combinada os testes melhoram significativamente a especificidade, mantendo alta sensibilidade, esta combinação de testes representa uma estratégia para o diagnóstico confiável de carcinoma induzido por HPV evitando-se que uma proporção de tumores será atribuída incorretamente ao HPV quando se realiza apenas a IHQ para p16 (PRIEGGE et al., 2017).

2.4.2 Proteína reguladora de ciclo celular - p21

A proteína reguladora de ciclo celular p21 é considerada uma inibidora de CDK, interagindo com seu domínio N-terminal, sendo definida como uma CDKI, levando à parada do ciclo celular e cessação da proliferação, sendo este um de seus efeitos regulatórios (ROMANOV; POSPELOV; POSPELOVA, 2012). A proteína p21 inibe diretamente a atividade do complexo ciclina-D1-CDK4 e p21 WAF/Cip1 irá competir com a ciclina D com a mesma intenção de provocar a parada no ciclo celular. O gene p21Waf1 foi identificado como dependente de p53, envolvido em pontos de verificação do ciclo celular, inibindo atividades dos complexos ciclina-E-CDK2 e ciclina-A-CDK2 nas fases G1 e S (Figura 7).

Figura 7 - Representação esquemática da regulação das atividades do complexo ciclina-E-CDK2 e ciclina-A-CDK2 que são responsáveis pela transição celular da fase G1 para a S e progressão na fase S, respectivamente.



Fonte: ROMANOV; POSPELOV; POSPELOVA, 2012.

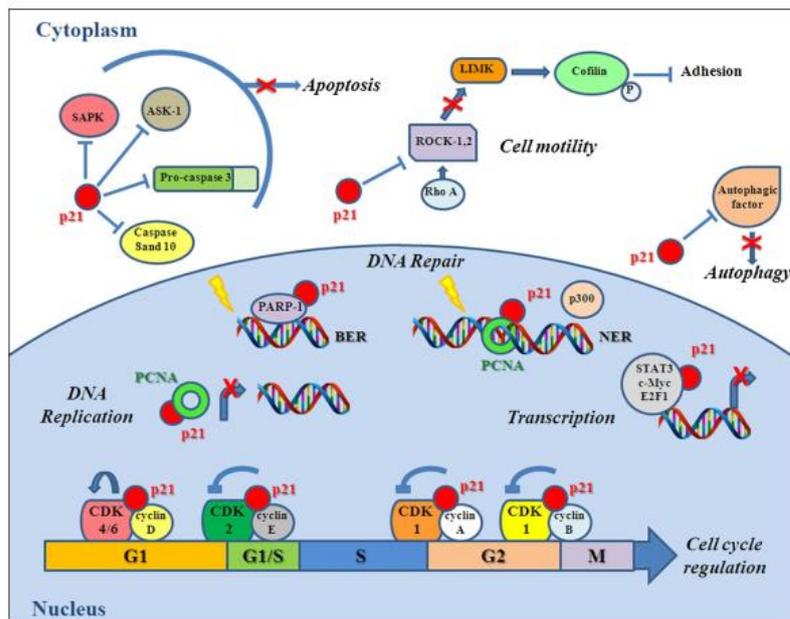
Algumas funções foram determinadas para p21 como regular a transcrição, restringir a apoptose, definir a dinâmica citoesquelética e a motilidade celular, interferir na diferenciação celular, na senescência e morte celular, atuar como regulador citoplasmático da importação nuclear, interferir no reparo do DNA e afetar a geração de células pluripotentes. O dano ao DNA leva à ativação da p53, o que, por sua vez, leva ao aumento dos níveis de p21, o que acaba por induzir a parada na fase G1 conduzindo ao reparo do DNA ou apoptose (DUTTO et al, 2015).

Outros autores sugerem um mecanismo no qual a p21 exerce sua ação anti-oncogênica, regulando negativamente a expressão do mRNA da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT) e atividade da telomerase, sendo a ativação da telomerase e expressão de mRNA uma das características marcantes em uma grande maioria dos cânceres (LEE et al., 2010). A senescência replicativa resultante de lesão do DNA nas regiões teloméricas na ausência de atividade da telomerase coincide com elevação da expressão de p21Waf1 e de seu acúmulo em resposta a danos no DNA (HERBIG et al., 2003).

A p21 pode ligar-se e inibir a atividade do antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA), uma subunidade da DNA polimerase com um papel central na replicação e reparo do DNA, a p21 interage com o PCNA através de sua região carboxi-terminal que também sinaliza quanto a sua localização, exportação nuclear e degradação. Esta ligação ao PCNA é considerada como outro mecanismo regulatório exercido pela proteína (MOLDOVAN; PFANDER; JENTSCH, 2007; PROSPERI, 2006),

A p21 foi considerada como uma proteína que apresenta funções antagônicas podendo atuar como um supressor tumoral através de seu comportamento regulatório ou como um oncogene. Estes dois efeitos estão na dependência da localização da proteína, no citoplasma parece atuar como um oncogene e no núcleo como supressora por inibição do ciclo celular (ABELLA et al. 2010; ROMANOV; POSPELOV; POSPELOVA, 2012). Sua atuação como um oncogene se dá pela inibição da apoptose, facilitando a migração e proliferação celular (Figura 8).

Figura 8 - Representação esquemática das principais interações de p21 com proteínas no núcleo e no citoplasma.



Fonte: DUTTO et al., 2015.

A expressão de p21 em epitélio escamoso normal é descrita em células imaturas, basais e suprabasais, mais indiferenciadas, não sendo encontrada em células superficiais maduras (QUEIRÓZ et al., 2010).

Se por um lado a expressão de p21 não foi significativamente diferente entre epitélio normal e CEO (QUEIRÓZ et al., 2010), em leucoplasias orais que apresentam displasias observa-se marcação nas camadas mais superiores ou diferenciadas do epitélio, em contraste com o epitélio normal. À medida que o grau de displasia aumenta no epitélio displásico a expressão de p21 também aumenta já no CEO a expressão é variável em áreas com células pouco diferenciadas (PÉREZ-SAYÁNS et al., 2013).

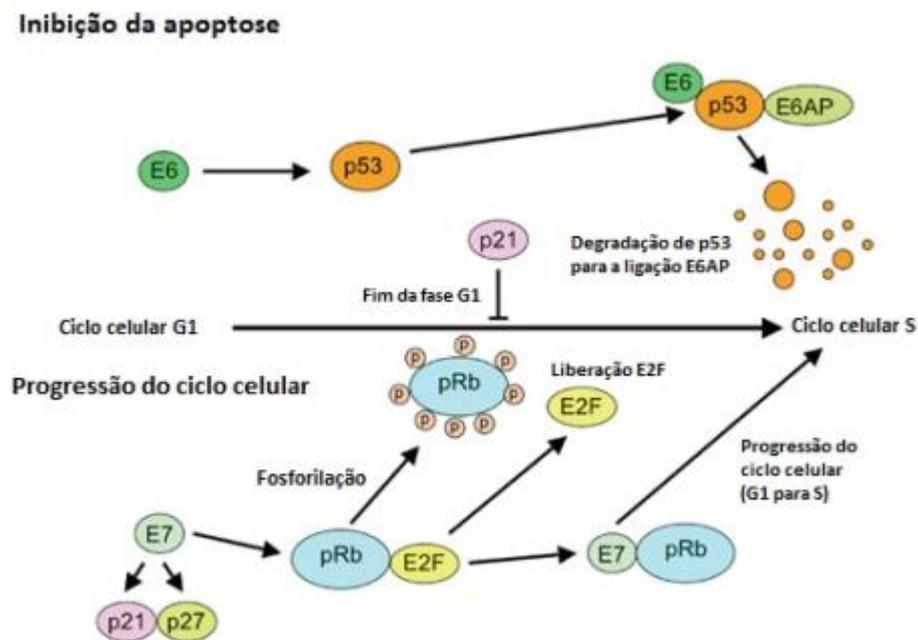
A ativação da p21 foi considerada em lesões displásicas da cavidade oral como o passo inicial para a transformação maligna em câncer oral. Em 75% dos casos de leucoplasias verrucosas expressaram p21 e 42% delas desenvolveram CEO (CHANG et al., 2000), sendo que, anteriormente, índices ainda maiores como 80% de leucoplasias com positividade exacerbada da p21 sofreram progressão para CEO (HOGMO et al., 1998).

Há alta associação de expressão de p21 e leucoplasias com índices de 96% de positividade para p21 nestas lesões com displasias epiteliais enquanto a positividade em amostras de CEO (77%) parece ser menor (KUDO et al., 1999)

A regulação por p21, em vários tipos de câncer, tem uma correlação positiva com a agressividade do tumor, estágio avançado e mau prognóstico, conforme revisado por Abbas e Dutta (2009), o que ressalta a importância de um entendimento mais aprofundado dos mecanismos relacionados à expressão desta proteína tanto no CEO como na progressão das lesões displásicas.

A proteína viral E7 do HPV também é capaz de se ligar à p21 e p27 podendo desregular o ciclo celular por revogar o efeito inibitório destas CDKIs (KUMAR et al., 2010; PÉREZ-SAYÁNS et al., 2013) (Figura 9).

Figura 9 - Representação esquemática das oncoproteínas virais E6 e E7 na inibição da apoptose induzida por HPV de alto risco oncogênico.



Fonte: SENBA; MORI, 2012.

Sabe-se que ocorre uma inibição da p21 em células com proteína viral E5 que forma um complexo hexamérico com viroporina em membranas celulares. Este complexo é necessário para a sinalização mitótica durante o ciclo de vida dos HR-HPVs sendo capaz de retardar a expressão do marcador de diferenciação celular durante as etapas produtivas do ciclo de vida do HPV18 (GHEIT, 2019).

A expressão da p21 pode ocorrer de forma dependente ou independente da p53. Em células diferenciadas pós-mitóticas, como células espinhosas em epitélios escamosos sua expressão é dependente da diferenciação celular e não da p53. Nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, verificou-se que a expressão de p21 é independente da presença de p53 funcional estando relacionada ao grau de diferenciação do tumor (PÉREZ-SAYÁNS et al., 2013).

Quanto ao valor prognóstico da expressão proteica, a p53 pode ser considerada um marcador de prognóstico favorável no CEO de baixo grau enquanto a p21 pode ser considerada um marcador de prognóstico desfavorável em pacientes com CEO de alto grau (MANDÚ et al., 2015).

No entanto, casos de carcinomas epidermóides orais HPV-positivos, a expressão da p21 relaciona-se ao prognóstico favorável, questionando-se o papel da p21 na progressão tumoral nestes tipos de carcinomas da cavidade oral (KIRITA; OMURA, 2015). Apesar das oncoproteínas do HPV aumentarem os níveis de p21 foi descartada a hipótese de que lesões infectadas por HPV que apresentam melhor prognóstico, se relacionem ao controle dependente da p21 (PÉREZ-SAYÁNS et al., 2013).

Assim, o significado clínico da expressão de p21 no CEO permanece sob investigação e ainda é controverso em relação aos CEOs positivos para HPV, quando se considera o pequeno número de estudos existentes e que sob certas condições e em contextos celulares específicos a p21 pode atuar como um oncogene.

2.4.3 Proteína Ki67

Ki67 é uma proteína nuclear não histona, necessária para proliferação celular associada a transcrição de RNA ribossômico, presente no núcleo em divisão. É considerada um marcador de proliferação celular e é expressa em todas as fases da divisão celular, com exceção da fase G1 inicial (KUMAR; KANE; RATHOD, 2012).

No epitélio normal do colo uterino a expressão de Ki67 fica restrita a camada basal devido a constante renovação das células desta camada já que sempre haverá células em mitose. Quando se observa a expressão em outras camadas do epitélio pode-se sugerir que há desregulação do ciclo celular que pode ser induzida por HPV no caso do colo uterino (SILVA, 2017)

A proteína nuclear Ki67 tem sido bastante estudada em tumores, geralmente sua identificação é evidenciada por meio da técnica de IHQ e seus índices tem bom valor preditivo da presença de células geneticamente alteradas na mucosa oral. A expressão elevada em tumores de cavidade oral e orofaringe demonstra que estes tumores possuem uma alta capacidade de proliferação e alta agressividade, representando assim um prognóstico desfavorável. O marcador possui um importante valor prognóstico na identificação de formas agressivas de tumores com alto índice de proliferação de células tumorais (EL-MOFTY; PATIL, 2006; KLIMOWICZ et al., 2012).

Na cavidade oral normal, especialmente na região do fornix do lábio superior foram observados altos índices (75%) de expressão de Ki67 em células basais do epitélio da mucosa e raramente observou-se expressão suprabasal da proteína (VALASH et al. (2017). Este padrão de expressão de ki67 também foi identificado na camada basal de epitélio normal da gengiva. Em pacientes com leucoplasia oral sem displasia, especialmente na língua, há aumento de expressão de ki67 nas células epiteliais na camada basal e suprabasal concomitantemente.

A expressão do Ki67 é maior em CEO do que em tecidos não tumorais, a expressão aumenta quando a displasia sofre progressão (KUMAR; KANE; RATHOD, 2012). A alta expressão do Ki67 em pacientes com CEO foi associada a piores graus de diferenciação tumoral e maior índice de metástase em linfonodo. A expressão aumentada do Ki67 pode ter um valor prognóstico independente e desfavorável pois pacientes com maior expressão de Ki67 foram correlacionados aos piores índices de sobrevivência e por sua associação com a progressão de lesões potencialmente malignas para CEO (JING et al., 2019).

A utilização do Ki67 também pode ter valor preditivo confiável quando se avalia a mucosa "não neoplásica" ao redor de um tumor primário. Há um aumento da expressão de ki67 na mucosa que circunscreve o carcinoma oral que estava associada a um prognóstico ruim em pacientes que foram acompanhados por longo prazo (GISSI et al., 2016). Desta maneira, há um indicativo de que este marcador tem relevância nas fases iniciais da carcinogênese oral.

Isto foi demonstrado em diversos estudos que analisaram o comportamento da expressão de Ki67 e p53 em CEO e lesão potencialmente maligna, onde encontraram uma expressão alterada desses dois marcadores na IHQ (GISSI et al., 2018; KUMAR; KANE; RATHOD, 2012; SINANOGLU; SOLUK-TEKKESIN; OLGAC, 2015, WAGNER;

CARDOSO; SANTOS, 2017). A co-expressão de p53 e Ki67 poderia ser usada para identificar lesões com alto risco de transformação neoplásica já que uma expressão aumentada destes biomarcadores foi relacionada ao aumento do grau de displasia (KUMAR; KANE; RATHOD, 2012).

A expressão de Ki67 aumenta significativamente quando se compara amostras da mucosa normal em relação a leucoplasia e CEO (WAGNER; CARDOSO; SANTOS, 2017), havendo uma correlação positiva entre expressão do Ki67 e gravidade da lesão (SINANOGU; SOLUK-TEKKESIN; OLGAC, 2015).

Por outro lado, outros autores caracterizaram que em leucoplasia oral há um aumento na expressão de p53 e sua diminuição combinada a alta expressão do Ki67 significativamente relacionada à displasia e a transformação neoplásica da leucoplasia (GISSI et al., 2018).

Em tumores malignos da cavidade oral há uma alta expressão de ki67 associada ao grau de diferenciação tumoral e crescimento tumoral agressivo (DRAGOMIR et al., 2012) sendo sua expressão em tumores benignos considerada mediana (VÉNOKY et al., 2008).

Apesar do Ki67 ser utilizado amplamente como marcador para lesões de maior grau de malignidade, ele apresenta baixa especificidade se comparado a outros marcadores como a podoplanina, em displasias presentes em leucoplasias orais (GISSI et al., 2018), indicando uma limitação no uso deste biomarcador e a constante busca de marcadores com maior especificidade para as leucoplasias.

Isto ocorre com a utilização do biomarcador p16 na identificação de lesões displásicas onde há maior especificidade da imunocoloração por p16 nestas lesões na mucosa oral. No entanto, a importância preditiva de p53 e Ki67 como marcadores na identificação das formas agressivas de carcinomas orais é relevante, tendo valor prognóstico especialmente para os carcinomas invasivos (DRAGOMIR et al., 2012).

2.5 Citoqueratinas (CKs)

As citoqueratinas (CKs) são filamentos proteicos intracitoplasmáticos que se constituem em componente importante do citoesqueleto, compreendem membros classificados de acordo com seu peso molecular e estruturas químicas, incluindo CK1 a CK8 (alto peso molecular, tipo básico ou neutro, tipo II) e CK9 a CK20 (baixo peso molecular, tipo ácido ou tipo I) (MEHRPOUYA et al., 2019).

CKs são críticas na estabilização celular, na forma da célula, sinalização intracelular e transporte (FROHWITTER et al., 2016). Apresentam funções tais como um papel nas vias de transdução de sinal, stress celular, apoptose (atuação de caspases), preservação das células epiteliais e atuam como marcadores de multiplicação celular. A expressão de CKs interfere em vias de regulação intracelulares, como quinases, numerosos receptores e proteínas apoptóticas, tendo por isso, efeitos altamente complexos (MEHRPOUYA et al., 2019).

A mucosa oral normal caracteriza-se por diferenças na expressão de citoqueratinas em relação as suas subclasses, de acordo com a região anatômica e sublocalidades na cavidade oral (PARAMIO; JORCANO, 2002). Citoqueratinas 1 e 10 são encontradas nas camadas suprabasais da mucosa mastigatória, já o palato mole expressa CK 7, 8 e 18 (BERKOVITZ et al., 2011) e realizam a proteção de células epiteliais em relação a pressão mecânica e não mecânica (estresse) que ocasionam morte celular. As CKs também emitem sinal quando uma célula responde ao estresse, apoptose e outras funções específicas podendo definir o padrão e nível da diferenciação de células epiteliais, além da queratinização epitelial (HANDAJANI; HANINDRIYO, 2018).

Diferentes forças mecânicas atuando sobre o epitélio são responsáveis pelo padrão de expressão das CKs, como observado em amostras de fornix de lábio superior cujos padrões fenotípicos de sua expressão diferem da gengiva. Isto se explica pela presença de células de Merkel que são mecanorreceptores positivos para CK 8 e 19, frequentemente encontradas no epitélio gengival e ausentes no fornix labial. As forças associadas à mastigação refletem no tecido próximo aos dentes estimulando a expressão destes tipos de CKs (VALASH et al., 2017).

As CKs constituem-se os principais marcadores de diferenciação do epitélio estratificado, podendo sofrer alteração quando a taxa de crescimento celular aumenta ou quando o grau de diferenciação celular é alterado patologicamente (LINDBERG; RHEINWALD, 1989).

Discute-se a possibilidade de utilização da CK19 como um marcador de displasia moderada a acentuada e carcinoma *in situ* no epitélio oral. O epitélio normal e hiperplásico expressam a CK 19 apenas na camada basal, outros autores não detectaram a expressão de CK19 em mucosa oral queratinizada, quando a mucosa se apresenta normal ou hiperplásica (FILLIES et al., 2007; SAITOH et al., 2016). Nas displasias a CK 19 é expressa na região basal e camadas celulares suprabasais, corando fortemente por IHQ (HANDAJANI; HANINDRIYO, 2018; PRABAKARAN; MUTHUKRISHNAN, 2014) ou em displasias acentuadas a expressão pode ocorrer apenas na camada basal (SAFADI; ALROMAIZAN; ALSHAGROUD, 2020). A sua expressão ocorre de forma ampla nos carcinomas epidermóides (HANDAJANI; HANINDRIYO, 2018).

Por outro lado, há um consenso na literatura quanto a expressão suprabasal de CK19 como indicativo do aumento do potencial para malignidade da lesão e como uma ferramenta válida para identificar células em transformação (PRABAKARAN; MUTHUKRISHNAN, 2014; SAFADI; ALROMAIZAN; ALSHAGROUD, 2020).

Os CEOs caracterizam-se pela expressão de CKs de baixo e alto peso molecular demonstrando a existência de duas vias na patogênese tumoral sendo a expressão de CK uma marca registrada da progressão do tumor. Esses carcinomas parecem apresentar uma via independente com expressão de citoqueratinas de alto e baixo peso molecular semelhante ao que já havia sido proposto para neoplasias intra-epiteliais escamosas do colo uterino e da vulva, associadas a vários tipos de HPV (SANTORO et al., 2015).

Nos CEOs a expressão de CKs foi significativamente diferente entre tumor no assoalho da boca quando comparado a outras localizações na cavidade oral. A expressão de CK8, 18 e 19 foi associada aos CEOs do assoalho da boca, enquanto em outras localidades houve uma expressão adicional de CK1 e 10. A cavidade oral é uma região anatômica altamente complexa, emergindo de vários arcos branquiais associados a uma agregação de mesênquima, ectoderma e endoderme, não se sabe

até que ponto a localização do tumor afeta sua biologia e seu prognóstico (VALASH et al., 2017).

A determinação dos padrões de expressão de citoqueratina nos tumores permite a tipagem tumoral, já que tumores epiteliais, incluindo suas metástases, mantem de forma mais ampla os padrões de citoqueratina do tecido epitelial de que se originou, isto fez com que as CKs passassem a ser marcadores epiteliais importantes em biologia celular, embriologia e patologia cirúrgica, rotineiramente realiza-se, em todo o mundo, a tipagem por IHQ no diagnóstico de tumores, (MOLL; DIVO; LANGHEIN, 2008).

De acordo com a literatura, CKs 8, 18 e 19 são expressas em carcinoma epidermoide hipóxico, pouco diferenciado (PRABAKARAN; MUTHUKRISHNAN, 2014) com um grau mais elevado de desregulação do ciclo celular, ao passo que CKs 1, 5, 6, 10 e 14 parecem ser expressos em tumores malignos bem diferenciados (FROHWITTER et al., 2016). Para alguns pesquisadores a CK19 tem papel estabelecido em aproximadamente 30% dos pacientes com carcinoma das células escamosas orais (ZHONG et al., 2007).

A CK14 tem sua síntese de RNAm restrita à camada basal do epitélio oral, podendo ser detectada nas camadas celulares suprabasais inferiores na mucosa já que permanece integrada ao citoesqueleto por algum tempo mesmo quando as células saem do compartimento basal (FILLIES et al. 2006; PRABAKARAN; MUTHUKRISHNAN, 2014).

A CK14 foi observada na camada basal de epitélio de mucosa oral normal e em todas as camadas epiteliais na displasia epitelial discreta, sugerindo que esta citoqueratina pode estar envolvida na alteração do epitélio normal para lesão pré-cancerígena, como nas leucoplasias. Em um estudo com leucoplasias, em 70% das amostras, pode-se observar uma forte expressão suprabasal de CK14 (VALASH et al., 2017) e marcação em todas as camadas epiteliais em amostras com hiperkeratose e displasia epitelial na língua (OKADA; MORIDE, 2010).

Parece haver uma correlação negativa da expressão de CK14 durante o processo de malignização da lesão (YOSHIDA et al., 2015).

Há em carcinomas localizados na língua um alto índice de expressão da CK14 demonstrando uma possível relação da expressão desta citoqueratina com determinadas localidades da cavidade oral (OKADA; MORIDE, 2010). Assim, a CK14 pode ser utilizada como auxiliar no diagnóstico a depender da região em que se encontra a lesão.

A interação HPV-DNA celular interfere no grau de diferenciação da célula por promover a proliferação celular na camada basal do epitélio, desregular a produção de citoqueratinas e mudança radical no metabolismo celular (SANTORO et al., 2015). Embora o processo de tradução do RNAm viral seja vinculado a diferenciação epitelial, as oncoproteínas virais são capazes de induzir a imortalização dos queratinócitos e causar a interrupção de expressão de CK de padrão normal no epitélio escamoso estratificado (SUN et al., 1993). Foram demonstrados, em amostras de colo uterino infectado pelo HPV, desvios na expressão de citoqueratinas de alto peso molecular (STAQUET; VIAC; THIVOLET, 1981; SYRJÄNEN et al. 1988). Em amostras HPV-positivas da mucosa oral normal de mulheres com infecções genitais por HPV há uma expressão de CK19 mais intensa na camada basal do tecido epitelial identificada por IHQ (KELLOKOSKI et al., 1991).

Em câncer de orofaringe com positividade para HR-HPV ocorre uma expressão constante de CK19 com coloração geralmente intensa e localização preferencialmente em camadas epiteliais superiores (SANTORO et al., 2015). Em áreas perilesionais do câncer de orofaringe ocorre positividade para CK19 distribuída em todas as camadas epiteliais, principalmente na camada basal, com percentual mais baixo nas amostras de câncer negativas para HR-HPV, havendo diferenças estatisticamente significantes em relação à localização da expressão de CK19 e ainda marcação no epitélio normal em áreas perilesionais e distante do tumor com variação de percentual, de intensidade e localização. Em áreas infectadas com HR-HPV com alterações pré-neoplásicas e áreas distantes do tumor, a CK19 se distribui em todas as camadas epiteliais, das basais às superficiais ou preferencialmente nos níveis superiores (SANTORO et al., 2015).

Quanto a relação da expressão de citoqueratinas com as proteínas reguladoras de ciclo celular sabe-se que CKs de alto peso molecular foram significativamente associadas à expressão de p21 e que CKs de baixo peso molecular tem um padrão

oposto as de alto peso molecular quanto à regulação do ciclo celular pela p21 (FROHWITTER et al., 2016).

As CKs vem sendo consideradas essenciais no diagnostico de lesões pre-neoplásicas e neoplásicas, como o CEO, através da IHQ (MIKAMI et al., 2015, MEHRPOUYA et al., 2019). Entretanto, a literatura considera adequada a utilização do teste combinado de IHQ para CK19 e p16 (AHMED et al., 2014) com teste molecular para detecção de HPV pois o uso isolado destas técnicas apresenta baixa sensibilidade e baixa especificidade em lesões orais (SANTORO et al., 2015). A expressão de CK19 foi associada com uma diminuição da taxa de sobrevivência de pacientes com carcinoma, o que é conflitante com o fato de que tumores HPV-positivos apresentam melhor prognóstico.

Desta forma, considera-se o fato de utilizar a CK19 para o diagnóstico diferencial entre lesões HPV-positivas e HPV-negativas em carcinomas e lesões pré-neoplásicas em associação a métodos de biologia molecular que são padrão ouro no diagnóstico de lesões infectadas pelo HPV.

Considerando-se os dados de literatura acerca de métodos isolados ou combinados para diagnósticos de carcinoma e leucoplasia oral e que ainda há vários resultados conflitantes em lesões HPV-positivas, propôs-se o estudo do comportamento da expressão de biomarcadores através de IHC associado a detecção de DNA de HPV por método de biologia molecular.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Relacionar a presença do Papilomavírus humano (HPV) com marcadores de proliferação, diferenciação e regulação de ciclo celular em leucoplasia e carcinoma epidermoide orais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença do *Papilomavírus humano* (HPV) por método de biologia molecular, utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em amostras de esfoliado de células da superfície das lesões e demais regiões da cavidade oral sem alteração clínica, de pacientes com leucoplasia e carcinoma orais.
- Identificar por IHQ a expressão de citoqueratina 14 e 19 em amostras de leucoplasia e carcinoma oral HPV-positivas e HPV-negativas, caracterizando o padrão de expressão nestas lesões.
- Caracterizar, em lesões orais HPV-positivas e HPV-negativas, a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular (p16 e p21) e de proliferação celular Ki67 por IHQ.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do estudo

Este estudo foi realizado como pesquisa quantitativa descritiva observacional, de corte transversal de esfoliado de células da cavidade oral e biópsia de lesão oral, do tipo não probabilístico por conveniência, envolvendo pacientes atendidos de setembro de 2018 a novembro de 2020, nas Clínicas da Faculdade de Odontologia (FAODO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande-MS e no Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) da Secretaria Municipal de Saúde (SESAU) de Campo Grande-MS.

4.2 Local da pesquisa

Este estudo foi desenvolvido, conforme autorização de cada setor, no laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios do Instituto de Biociências (INBIO), no laboratório de Histotécnicas do setor de Histologia do Instituto de Biociências (INBIO), no Laboratório de Patologia Bucal e nas Clínicas da Faculdade de Odontologia (FAODO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande-MS e no Centro de Especialidades Odontológicas (CEO-SESAU) de Campo Grande-MS.

4.3 Participante da pesquisa

Participaram deste estudo pacientes atendidos nas clínicas da FAODO e no CEO da SESAU conforme autorização anexa (anexo I e II) durante o período de setembro de 2018 a novembro de 2020, pacientes de ambos os sexos, acima de 18 anos de idade, que apresentaram lesões em mucosa oral classificadas clinicamente como leucoplasia e/ou carcinoma epidermoide oral (CEO), e que estavam de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

Os pacientes foram informados sobre: os objetivos do estudo; sobre a metodologia de coleta de dados secundários e amostras; sobre a possibilidade de

risco ou desconforto decorrente da participação na pesquisa; e sobre o acompanhamento do paciente durante o estudo pelos pesquisadores. O paciente foi também informado sobre a continuidade do seu tratamento odontológico independente do término ou interrupção da pesquisa; sobre a opção de obter o resultado da análise da amostra; sobre a plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma; sobre o sigilo dos dados e resultados obtidos em todas as fases da pesquisa e outras em acordo com a Res. 466 de 12 de dezembro de 2012 do CNS.

Foram estabelecidos os seguintes critérios de exclusão: pacientes menores de 18 anos de ambos os sexos, gestantes e pacientes que não apresentaram lesões classificadas clinicamente como leucoplasia e/ou carcinoma epidermoide oral (CEO).

4.4 Dados Secundários

Foram coletados dados secundários dos participantes da pesquisa através da aplicação de questionário adaptado (Apêndice B), utilizando um conjunto de perguntas fechadas e mistas, relacionadas a fatores sócio-comportamentais. O questionário abordou além de fatores socioeconômicos, também fatores epidemiológicos relacionados ao risco de progressão maligna, tais como sexo, idade, consumo de álcool e de tabaco.

4.5 Procedimentos e técnicas

4.5.1 Coleta das amostras

Para a detecção do HPV por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram coletadas células esfoliadas obtidas da superfície das lesões e da superfície das demais regiões da mucosa oral que não apresentavam lesões em cada participante da pesquisa. As coletas foram realizadas segundo Machado (2013), por meio de 5-10 gentis escovações, utilizando escova cervical com ponta protegida, por procedimento não invasivo, sem riscos de traumas ou lacerações ao paciente. Após a esfoliação celular as escovas foram acondicionadas em tubos cônicos do tipo Falcon com

capacidade de 15 ml e armazenadas sob refrigeração a -20°C até o momento da realização dos testes moleculares.

Após a coleta para detecção do HPV, os pacientes foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para biópsia das lesões seguindo rotina adotada nos atendimentos das Clínicas Odontológicas para o diagnóstico histopatológico das lesões.

Para a análise histopatológica e imuno-histoquímica, as amostras foram obtidas por biópsia incisional, utilizando anestesia infiltrativa com octopressin 3%, material cirúrgico como cabo de bisturi tipo Baden-Parker e lâmina de bisturi 15c, curetas de periodontia, tesouras de ponta romba e fina, porta agulha, agulha e fio de sutura de seda, gerando o mínimo de desconforto possível ao paciente.

Após o procedimento o paciente foi medicado com analgésico e orientado a reportar qualquer reação adversa aos responsáveis pela pesquisa, para o devido encaminhamento ao atendimento clínico-odontológico.

4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.5.2.1 Extração das amostras

A extração das amostras foi feita pela técnica de fenol-clorofórmio devido ao seu alto rendimento e baixo custo. Em capela de fluxo laminar as amostras foram lavadas com solução detergente SDS 10% e adicionou-se a Proteinase K (20mg/ml), em seguida, essas amostras foram colocadas em banho-maria seco a 37°C , por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, foram lavadas com fenol/clorofórmio e centrifugadas, retirando-se o sobrenadante e transferindo para outro eppendorf, onde foram acrescentados acetato de sódio 5M (Ph 3,00) e álcool absoluto gelado; depois, armazenados por cerca de 12 horas no congelador. Após esse tempo, as amostras foram lavadas em álcool 70% e desidratadas em banho-maria seco, sendo por fim reidratadas em tampão de amostra, permanecendo na geladeira por 24 horas. As amostras ficaram armazenadas a -20°C .

4.5.2.2 Dosagem

As amostras a serem analisadas tiveram a sua pureza e a sua concentração de material genético definidos com a dosagem deste conteúdo, pelo equipamento de espectrofotometria da marca Biodrop, com o comprimento de onda de 260 e 280 nm.

4.5.2.3 *Nested* PCR PGMY/GP+

Para um controle endógeno da reação de PCR, foram utilizados os primers para β -globina, PC04 e GH20, amplificando um fragmento de 286pb, presentes no DNA humano (BAUER et al., 1991) e para detectar a presença do DNA do HPV nas amostras foi utilizado um pool de primers PGMY 09/11, que amplifica um fragmento de 450pb da região L1 do genoma viral (GRAVITT et al., 2000). Em uma segunda etapa, para obter uma especificidade maior nas amostras, foram utilizados os primers para HPV: GP5+ e GP6+, que amplificam um fragmento de 150pb da região L1 (QU et al., 1997).

Foi separada uma alíquota de 5 μ l dos produtos β -globina/positivos e então adicionada à volume final de 45 μ l da seguinte solução preparada em capela de fluxo laminar: tampão para PCR Tris-EDTA pH 8,3 [10X]; MgCl₂ 50mM; dNTPs 2,5mM; enzima Taq polimerase; primer para HPV GP5+ 10mM; primer para HPV GP6+ 10mM e H₂O ultra pura. Os produtos foram mantidos em geladeira até a etapa de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

4.5.2.4 Detecção dos produtos da PCR

Foram pipetados 8 μ l do produto da PCR e adicionados a 3 μ l da solução tampão [2X] de corrida de azul de bromofenol. A mistura obtida foi aplicada no gel de agarose 1,5%, com 5 μ l do marcador de pares de bases (100pb). A fonte foi ajustada para 100V, realizando-se a corrida por 1 hora. O gel foi corado em brometo de etídio e observado no transiluminador (UV) e fotodocumentado pelo equipamento UVP, sendo os resultados obtidos pelo Software Doc. It-LS.

4.5.3 Análise Histopatológica

Os fragmentos obtidos por biópsia incisional foram fixados em formol a 10% e emblocados em parafina. Foram obtidos cortes de 5µm de espessura corados com a técnica clássica de Hematoxilina e Eosina (HE), sendo então encaminhados para análise histopatológica quanto ao padrão morfológico das lesões. As lâminas foram observadas em microscópio de luz nos aumentos de 40, 100 e 400 vezes.

Para a classificação das amostras foram consideradas as seguintes características histopatológicas segundo sistema de World Health Organization (PARLATESCU et al., 2014; RODRIGUES et al., 2000): leucoplasia que apresentava hiperqueratose com ausência de displasia epitelial; leucoplasia com displasia epitelial discreta cujo tecido epitelial estratificado pavimentoso apresentava-se com projeções das cristas epiteliais profundas e anastomosadas, células das camadas basal e parabasal proliferativas assim como hiper cromatismo nuclear e nucléolos evidentes; leucoplasia com displasia epitelial moderada com hiperatividade da camada basal, cujas células basais e parabasais apresentavam atipias como pleomorfismo, núcleos hiper cromáticos e relação núcleo/citoplasma aumentada; e carcinoma epidermóide com várias atipias celulares, como pleomorfismo e hiper cromatismo nuclear, mitoses atípicas, nucléolos grandes e eosinofílicos e inversão de polaridade das células basais (BÁNÓCZY; SIBA, 1976; REIBEL; HILLE, 2017).

As amostras analisadas foram divididas em 3 grupos de acordo com os achados histopatológicos (YOSHIDA et al., 2015): leucoplasia sem displasia cujos pacientes estavam na faixa etária entre 50 e 71 anos; leucoplasia com displasia (grupo formado por leucoplasias com displasias discreta e moderada) na faixa etária de 35 a 84 anos; e carcinoma epidermóide com idades entre 39 e 74 anos.

4.5.4 Imuno-histoquímica de marcação simples

Para a avaliação imuno-histoquímica, novos cortes histológicos foram realizados a partir dos fragmentos das lesões emblocadas em parafina.

A técnica de marcação simples por imuno-histoquímica foi utilizada para identificar queratinócitos expressando citoqueratina (CK) 14 e 19, as proteínas p16, p 21 e Ki67. Para revelação da reação de imuno-histoquímica, foi utilizado o sistema *HiDef Detection™* (Cell Marque, Rocklin, CA, USA), composto por dois reagentes, descritos a seguir como reagentes 1 e 2. Controles positivos e negativos (sem adição dos anticorpos primários) foram desenvolvidos utilizando-se cortes histológicos de tonsila humana para p16 e ki67, pele para citoqueratinas 14 e 19 e câncer cervical para p21.

Os cortes histológicos de 3µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e depositados em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropyltriethoxi-silano (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA). A desparafinização foi realizada em estufa a 60°C overnight e posterior banho em xilol, por 30 minutos, a 60°C. Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol: 100% (3X), 95% (1X), 80%(1X) e em água de torneira por 30 segundos, depois em água destilada rapidamente.

Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em calor úmido com tampão EDTA 10 mM (pH 8,0) para o anticorpo anti-CK14, Citrato 10mM (pH 6,0) para o anticorpo anti-p16 e anti-ki67; e Tris EDTA (pH 9,0) para os anticorpos anti-CK 19 e anti-p21. As lâminas permaneceram sob alta pressão por 1 minuto e trinta segundos. Após resfriamento dos cortes por 20 minutos, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com três banhos de 10 minutos com peróxido de hidrogênio à 3%. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e em PBS (pH 7,2) por 5 minutos. Além do bloqueio com o peróxido de hidrogênio, também foi realizado o bloqueio com soro fetal bovino a 2%, com a finalidade de bloquear sítios de ligações inespecíficas dos anticorpos.

Os anticorpos primários anti-CK14 (Abcam, Cambridge, UK - clone: EPR17350); anti-CK 19 (Abcam, Cambridge, UK - clone: EP158OY); anti-p16 (Abcam, Cambridge, UK - EPR1473), anti-p21 (Abcam, Cambridge, UK - clone: EPR362) e anti-

Ki67 (Abcam, Cambridge, UK – clone:EPR3610) foram utilizados na diluição 1:200, 1:800, 1:1000, 1:250 e 1:500, respectivamente. Para cada marcação aplicou-se 100 µL do anticorpo diluído em cada lâmina e foram incubados em câmara úmida à temperatura ambiente por 1 hora. Após a incubação as lâminas foram lavadas com PBS por 3 minutos (3X) para remoção do anticorpo não ligado.

Em seguida, duas gotas do reagente Amplificador (reagente 1) foram aplicadas sobre o tecido e incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS por 3 minutos (3X), mais duas gotas do reagente Polímero / HRP (reagente 2) foram aplicadas e foi feita a incubação durante 10 minutos, seguido de nova lavagem por 3 minutos (3X).

A solução de Diaminobenzidina (DAB) (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil) foi preparada conforme instruções do fabricante. Aplicou-se 100 µL deste cromógeno sobre as lâminas, posteriormente foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, os espécimes foram lavados cuidadosamente com água destilada, recolhendo-se o resíduo em recipiente plástico para posterior descarte junto a materiais de risco biológico e contra-corados em Hematoxilina de Harris. Finalmente, os cortes foram desidratados com banhos em concentrações crescentes de etanol 80% (1X), 95%(1X) e 100% (3X) e 3 banhos de xilol por 30 segundos cada. As lamínulas foram adicionadas sobre as lâminas com Entelan® (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Germany) e posteriormente analisadas.

4.5.5 Avaliação quantitativa das lâminas submetidas à técnica de imunohistoquímica.

A análise das amostras com imunomarcção por p21 e ki67 foi realizada em microscopia de luz para a contagem de núcleos marcados por IHQ.

As lâminas foram fotodocumentadas pela câmara fotográfica digital Moticam 2300 3.0 Megapixels acoplada ao microscópio óptico Nikon Eclipse E200, utilizando-se aumento de 400x. Para a captura das imagens, foi utilizado o programa Motic Images Plus 2.0 e, para quantificação das células imunomarcadas, o software de análise de imagem digital ImageJ do National Institutes of Health, EUA com o pacote de “plug-ins” desenvolvido pela Universidade MacMaster (<http://www.macbiophotonics.ca/imagej>).

Foram capturadas 10 imagens de cada lâmina marcada com anticorpos anti-p21 e ki67, com tamanho de 1024x768 pixels e com barra de escala de 10 μ m padronizada à marca do microscópio utilizado. A partir da barra de escala, o tamanho das imagens foi convertido de pixels para μ m no software Image J, utilizando-se a ferramenta *freehand line*. Foram contadas as células que apresentaram núcleos imunomarcados em 10 imagens por amostra, utilizando-se o plugin “*Cell Counter*” do software Image J. Realizou-se o cálculo de conversão da área fixa da imagem de 21.845,76 μ m² (1 campo) através da multiplicação do número de células contadas por 1000 μ m² (correspondendo a 1mm) e sua divisão pela área fixa que corresponde a 1 campo. O resultado em mm foi multiplicado por 1000 a fim de que a quantidade de células imunomarcadas fosse expressas por mm².

4.5.6 Avaliação qualitativa das lâminas submetidas à técnica de imunohistoquímica.

A análise das amostras com imunomarcação por p16 foi realizada em microscopia de luz, de acordo com as recomendações do LAST consensus (DARRAGH et al., 2012) onde foram consideradas como amostras positivas para p16 as quais apresentaram pelo menos 1/3 do epitélio (preferencialmente inferior) marcado de forma difusa com intensidade moderada ou acentuada.

A análise das amostras com imunomarcação pelas citoqueratinas 14 e 19 foi realizada em microscopia de luz e foram classificadas segundo Okada; Moride (2010), Mikami et al. (2015), Santoro et al. (2015) quanto à distribuição ao longo das camadas epiteliais em basal ou difusa em diversas camadas epiteliais; e a intensidade de marcação de acordo com a tonalidade de marrom em: discreta (marrom acastanhado), moderada (marrom), acentuada (marrom escuro) ou negativa na ausência de qualquer célula epitelial marcada. Foram definidos scores para as amostras com marcação por CK14: 1 para marcação difusa discreta, 2 para difusa moderada e 3 para difusa acentuada. As amostras marcadas com CK19 foram classificadas em score: 0 quando negativa; 1 para marcação da camada basal e 2 para marcação difusa em diversas camadas epiteliais.

4.5.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SPSS 23.0. As tabelas de contingência de lesões histopatológicas e intensidade de marcação por imuno-histoquímica foram comparadas utilizando o teste X^2 Qui-quadrado de Pearson com 95% de intervalo de confiança. Para a comparação das médias de células contadas na análise quantitativa foi aplicado o teste ANOVA pós-teste Student-Newman-keuls.

4.5.8 Aspectos éticos

Esta tese teve sua aprovação concedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS (CEP/UFMS) **Número do Parecer:** 2.621.049 de 24/04/2018 (Anexo III). Cada participante da pesquisa forneceu uma autorização por escrito, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

5 RESULTADOS

5.1 População em estudo

Participaram deste estudo, 37 pacientes atendidos de setembro de 2018 a novembro de 2020, nas Clínicas da FAODO e Centro de Especialidades Odontológicas da Secretaria Municipal de Saúde (SESAU) que responderam ao questionário sócio-epidemiológico e foram submetidos a coleta de esfregaço de células e biópsias na cavidade oral apresentando clinicamente leucoplasia e carcinoma epidermoide oral.

Dentre os componentes da população estudada 75,7% (28/37) eram do sexo masculino e 24,3% (9/37) pertenciam ao sexo feminino. A faixa etária variou de 35 a 84 anos e a média de idade dos participantes foi de $56,03 \pm 11,89$, sendo que, 32,4% (12/37) tinham menos de 50 anos; 51,4% (19/37) de 50 anos a 69 anos e 16,2% (6/37) tinham 70 anos ou mais. Quanto a raça: 29,7% (11/37) declararam-se brancos; 35,1% (13/37) pretos; 32,4% (12/37) pardos e 2,7% (1/37) amarelo. Quanto ao estado civil 24,3% (9/37) eram solteiros; 56,8% (21/37) eram casados; 18,9% (7/37) separados ou viúvos (Tabela 1).

Com relação à escolaridade, 10,8% declararam-se analfabetos (4/37), 56,8% (21/37) concluíram o ensino fundamental ou apresentavam ensino fundamental incompleto, 24,3% (9/37) concluíram o ensino médio, 8,9% (1/37) e 14,5% (3/37) concluíram o ensino superior ou pós-graduação (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis, sexo, faixa etária, raça, estado civil, grau de escolaridade em Campo Grande, MS – 2021.

Variáveis	Total			
	N.	%	N.	%
Sexo				
Masculino	28	75,7		
Feminino	9	24,3	37	100,0
Idade				
<50 anos	12	32,4		
50 a 69 anos	19	51,4		
>69 anos	6	16,2	37	100,0
Raça				
Branco	11	29,7		
Preto	13	35,1		
Pardo	12	32,4		
Amarelo	1	2,7	37	100,0
Escolaridade				
Analfabeto	4	10,8		
Ensino fundamental completo/ incompleto	21	56,8		
Ensino médio	9	24,3		
Ensino superior/ Pós-graduação	3	14,5	37	100,0
Estado Civil				
Solteiro	9	24,3		
Casado	21	56,8		
Separado/ Viúvo	7	18,9	37	100,0

Nº: Número de participantes que responderam a estas questões; %: Porcentagem

A média de idade da primeira relação sexual foi de $18,5 \pm 0,7$ anos, havendo 27 respostas válidas. O início da vida sexual antes ou até os 18 anos de idade foram relatados por 70,4% (19/27) pacientes e aos 19 anos ou após esta idade por 29,6% (8/27). Quanto ao número de parceiros sexuais nos últimos dois anos houve também 27 respostas válidas, 74,1% (20/27) tiveram apenas 1 parceiro, 14,8% (4/27) 2

parceiros e 11,1% (3/27) 3 parceiros sexuais. Houveram 16 respostas válidas para o número de parceiros desde a primeira relação sexual onde a média foi de 6,2; sendo que 31,3% (5/16) tiveram 7 ou mais parceiros e 68,7% (11/16) tiveram 6 parceiros ou menos.

Tabela 2– Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com variáveis, idade da primeira relação, número de parceiros sexuais nos últimos 2 anos, número de parceiros sexuais desde a primeira relação sexual, uso de preservativo, prática de sexo oral, relato de IST, em Campo Grande, MS – 2021.

Variáveis	Total			
	N.	%	N.	%
Idade da primeira relação sexual				
≤ 18 anos	19	70,4		
≥ 19 anos	8	29,6	27	100,0
Número de parceiros sexuais nos últimos 2 anos				
2 anos				
1	20	74,1		
2	4	14,8		
3	3	11,1	27	100,0
Número de parceiros sexuais desde a primeira relação sexual.				
≤ 6	11	68,7		
≥ 7	5	31,3	16	100,0
Uso de preservativo				
Sim	9	27,3		
Não	24	72,7	33	100,0
Pratica sexo oral				
Sim	10	31,3		
Não	22	68,7	32	100,0
Relato de IST				
Sim	4	11,4		
Não	31	88,6	35	100,0

Nº: Número de participantes que responderam a estas questões; %: Porcentagem

Quando se questionou sobre o uso de preservativo houveram 33 respostas válidas; 27,3% (9/33) responderam que sim e 72,7% (24/33) responderam que não. Para a prática de sexo oral houve 32 respostas válidas, 31,3% (10/32) responderam que sim; 68,7% (22/32) responderam que não. Houve 35 respostas válidas para relato de infecção sexualmente transmissível (IST), sendo que 11,4% (4/35) responderam que sim e 88,6% (31/35) responderam que não (Tabela 2).

Tabela 3 – Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com variáveis, uso de drogas, uso de tabaco, ingestão de álcool, uso contínuo de medicamentos, lesão anterior na boca, uso de prótese dentária, em Campo Grande, MS – 2021.

Variáveis	Total			
	N.	%	N.	%
Uso de drogas				
Sim	0	0		
Não	36	100	36	100,0
Uso de tabaco				
Sim	21	58,4		
Não	15	41,6	36	100,0
Ingestão de álcool				
Sim	17	45,9		
Não	20	54,1	37	100,0
Uso contínuo de medicamentos				
Sim	12	32,4		
Não	25	67,6	37	100,0
Lesão anterior na boca				
Sim	9	24,3		
Não	28	75,7	37	100,0
Uso de prótese dentária				
Sim	19	51,4		
Não	18	48,6	37	100,0

N°: Número de participantes que responderam a estas questões; %: Porcentagem

Em relação ao uso de drogas houveram 36 respostas válidas e 100% (36/36) responderam que não. Para uso de tabaco houveram 36 respostas válidas, 58,4% (21/36) responderam que sim; 41,6% (15/36) responderam que não. Quanto a ingestão de álcool, 45,9% (17/37) responderam que sim e 54,1% (20/37) responderam que não. Quando se questionou sobre uso contínuo de medicamentos 32,4% (12/37) responderam que sim e 67,6% (25/37) responderam que não. Não houveram respostas válidas para o tipo de IST, tipo de bebida alcoólica, medicação, assim como, para a frequência da ingestão alcoólica e uso de tabaco, portanto, estes dados não foram incluídos na análise dos dados (Tabela 3)

Quando os participantes foram questionados sobre já terem apresentado lesão na boca; 24,3% (9/37) responderam que sim; 75,7% (28/37) responderam que não. Não houveram respostas válidas para o tipo de lesão que já tinham apresentado anteriormente, este dado não foi incluído na análise estatística. Quanto ao uso de prótese dentária; 51,4% (19/37) utilizavam e 48,6% (18/37) não utilizavam, no entanto, quanto ao tipo de prótese não houveram respostas válidas não sendo incluído na análise dos dados (Tabela 3).

5.2 Laudo histopatológico

Os participantes da pesquisa foram divididos em grupos segundo o tipo de lesão caracterizada em laudo histopatológico de amostras de biópsia de mucosa oral coradas em H.E. como demonstrado na figura 10.

A tabela 4 apresenta a frequência das lesões de acordo com os achados histopatológicos, em pacientes submetidos a biópsia.

Tabela 4 – Distribuição das amostras dos indivíduos que participaram da pesquisa, segundo tipo de lesão baseado em laudo histopatológico, em Campo Grande – 2021.

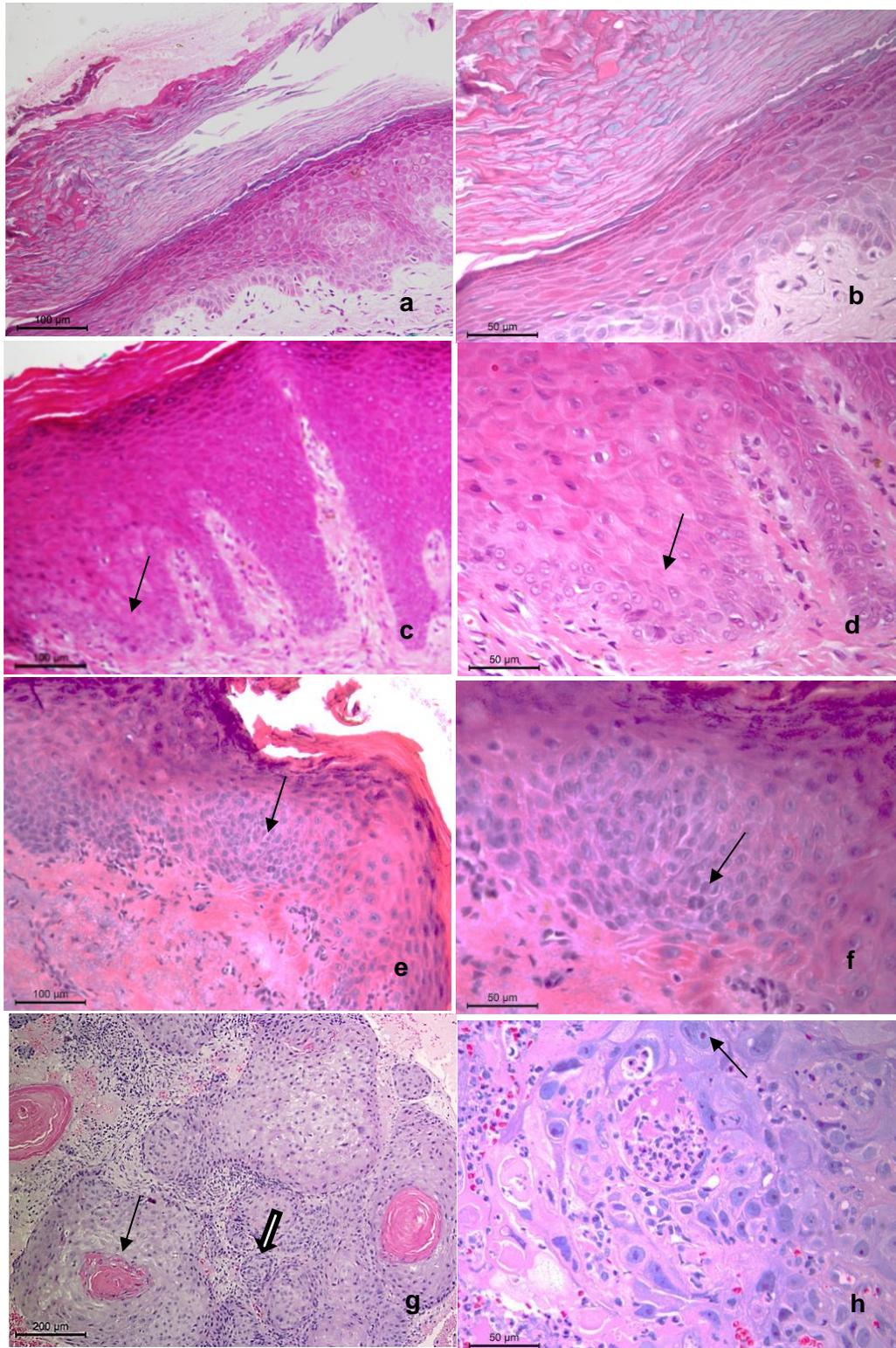
Tipo de Lesão	N°	%
Leucoplasia sem displasia	6	16,2
Leucoplasia com displasia	16	43,3
Carcinoma Epidermoide	15	40,5
Total	37	100,0

N°: Número de amostras; %: Porcentagem

Quanto a localização das lesões: lábio 24,3% (9/37); língua 18,9% (7/37); rebordo alveolar 35,1% (13/37); mucosa jugal 13,5% (5/37); assoalho bucal 2,7% (1/37); palato 2,7% (1/37) e arco palatoglossal 2,7 (1/37). Clinicamente, 15 amostras (40,5%) das lesões coletadas foram diagnosticadas como carcinomas, 6,7% (1/15) em palato, 33,3% (5/15) em lábio, 33,3% (5/15) em língua e 26,7% (4/15) em rebordo alveolar. As demais lesões foram caracterizadas clinicamente como leucoplasia compreendendo 22 amostras (59,5%), sendo que 27,3% (6/22) eram leucoplasia sem displasia e 72,7% (16/22) leucoplasia com displasia (Tabela 6).

As leucoplasias sem displasia estavam localizadas: 66,7% (4/6) em mucosa jugal e 33,3% (2/6) em rebordo alveolar. Quanto a localização das leucoplasias com displasia: lábio 24,3% (9/16); língua 18,9% (7/16); rebordo alveolar 43,% (7/16); mucosa jugal 6,3% (1/16); assoalho bucal 6,3% (1/16); e arco palatoglossal 6,3% (1/16).

Figura 10 – Achados histopatológicos das biópsias da lesão de cavidade oral corados em H.E. de pacientes que participaram da pesquisa - Campo Grande – MS, 2021.



Nota: a: Leucoplasia sem displasia epitelial com hiperqueratose (200x); b: Leucoplasia sem displasia com hiperqueratose (400x); c: Leucoplasia com displasia epitelial discreta apresentando projeções das cristas epiteliais (seta) (200x); d: Leucoplasia com displasia epitelial discreta com células das camadas basal e parabasal proliferativas (seta)(400x); e: Leucoplasia com displasia epitelial moderada com hiperatividade da camada basal, cujas células basais e parabasais apresentavam atipias (seta)(200x); f: Leucoplasia com displasia epitelial moderada como pleomorfismo (seta)(400x); g: carcinoma epidermóide com perlas córneas (seta) invasão da lamina própria (seta vazada) (100x); h: carcinoma epidermóide com várias atipias celulares, como pleomorfismo e nucléolos grandes e eosinofílicos (seta) (400x).

Dentre os pacientes com leucoplasia sem displasia 8,1% (3/37) eram do sexo masculino e 8,1% (3/37) eram do sexo feminino, no entanto, pacientes que apresentaram leucoplasia com displasia 35,1% (13/37) eram do sexo masculino e 8,1% (3/37) eram do sexo feminino. Para os carcinomas 32,4% (12/37) eram do sexo masculino e 8,1% (3/37) pertenciam ao sexo feminino. Quanto a faixa etária, 16,2% (6/37) dos participantes com leucoplasia tinham menos de 50 anos; 18,9% (7/37) de 50 anos a 69 anos e 8,1% (3/37) tinham 70 anos ou mais. Para leucoplasia sem displasia nenhum participante tinha menos de 50 anos; 13,5% (5/37) de 50 anos a 69 anos e 2,7% (1/37) tinham 70 anos ou mais. Para leucoplasia com displasia 16,2% (6/37) dos participantes tinham menos de 50 anos; 18,9% (7/37) de 50 anos a 69 anos e 8,1% (3/37) tinham 70 anos ou mais. Dentre os pacientes com carcinoma 16,2% (6/37) tinham menos de 50 anos; 18,9% (7/37) de 50 anos a 69 anos e 5,4% (2/37) tinham 70 anos ou mais.

Dentre os pacientes com leucoplasia sem displasia 8,3% (3/37) eram tabagistas e 8,3% (3/37) ingeriam bebida alcóolica. Para os pacientes com leucoplasia com displasia 25,0% (9/36) eram tabagistas e 16,2% (6/37) ingeriam bebida alcóolica. Dentre os pacientes com carcinoma epidermoide 25,0% (9/36) faziam uso de tabaco e 27,0% dos pacientes (10/37) ingeriam bebida alcóolica.

Quanto ao local da lesão: rebordo alveolar- 18,9% (7/37) em leucoplasia com displasia; 10,8% (4/37) em carcinoma e 5,4% em leucoplasia sem displasia; mucosa jugal- 10,8% (4/37) em leucoplasia sem displasia e 2,7% (1/37) em leucoplasia com displasia e nenhuma amostra em carcinoma epidermoide. Amostras de lábio e língua estavam distribuídas entre leucoplasias com displasias 10,8% (4/37) e 5,4% (2/37), respectivamente, e carcinomas 13,5% (5/37) para as duas localizações. Lesões em assoalho bucal 2,7% (1/37), palato 2,7% (1/37) e arco palatoglossal 2,7% (1/37) apresentavam como laudo, leucoplasia com displasia, carcinoma e leucoplasia com displasia, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes que participaram da pesquisa de acordo com o tipo de lesão, segundo sexo, idade, local da lesão, uso de tabaco e ingestão de álcool, em Campo Grande –MS, 2021.

Variáveis	Leucoplasia sem displasia		Leucoplasia com displasia		Carcinoma Epidermoide		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sexo								
Masculino	3	8,1	13	35,1	12	32,4		
Feminino	3	8,1	3	8,1	3	8,1		
Total	6	16,2	16	43,2	15	40,5	37	100,0
Idade								
<50 anos	-	-	6	16,2	6	16,2		
50 a 69 anos	5	13,5	7	18,9	7	18,9		
>69 anos	1	2,7	3	8,1	2	5,4		
Total	6	16,2	16	43,2	15	40,5	37	100,0
Local da Lesão								
Lábio	-	-	4	10,8	5	13,5		
Língua	-	-	2	5,4	5	13,5		
Rebordo alveolar	2	5,4	7	18,9	4	10,8		
Mucosa jugal	4	10,8	1	2,7	-	-		
Assoalho bucal	-	-	1	2,7	-	-		
Palato	-	-	-	-	1	2,7		
Arco palatoglossal	-	-	1	2,7	-	-		
Total	6	16,2	16	43,2	15	40,5	37	100,0
Uso Tabaco*								
Sim	3	8,3	9	25,0	9	25,0		
Não	3	8,3	6	16,7	6	16,7		
Total	6	16,6	15	41,7	15	41,7	36	100,0
Ingestão Álcool								
Sim	1	2,7	6	16,2	10	27,0		
Não	5	13,5	10	27,0	5	13,5		
Total	6	16,2	16	43,2	15	40,5	37	100,0

Nº: Número de amostras; %: Porcentagem, *1 paciente não respondeu.

5.3 Detecção de DNA-HPV

Dentre as 74 amostras obtidas da superfície da lesão e das demais regiões da cavidade oral, 4,0% (3/74) das amostras cuja coleta foi realizada na superfície da lesão, foram negativas para a amplificação de β -globina humana, sendo então excluídas do estudo.

Na detecção do DNA-HPV por Nested PCR PGMY 09/11/ GP5+ e GP6+, 27,0% (10/37) dos pacientes apresentaram amostras positivas. Foi possível observar que dentre os 10 pacientes em que foi identificado HPV, apenas um paciente apresentou as duas amostras positivas, ou seja, nos pacientes com amostra positiva para superfície da lesão não foi possível detectar o vírus em outras áreas da cavidade oral, com exceção de um único paciente que apresentou positividade nas duas coletas realizadas.

Em 6 amostras houve positividade na superfície da lesão e nas demais áreas da cavidade oral em 5 amostras analisadas. Houve positividade na reação em esfoliado de células da superfície da lesão em 2 pacientes com carcinoma epidermoide, em 3 pacientes com leucoplasia com displasia e em 1 paciente com leucoplasia sem displasia.

Nas amostras de esfoliado de células coletadas nas demais áreas da cavidade oral, a detecção do HPV ocorreu em 1 amostra de leucoplasia sem displasia, 3 amostras de leucoplasia com displasia e 1 amostra de paciente com diagnóstico de carcinoma epidermoide, sendo que foi em um dos pacientes com leucoplasia com displasia em que o vírus também estava presente no sítio da lesão.

As leucoplasias sem displasia (2/10) foram 20,0% das amostras positivas para DNA-HPV, seguidas com amostras de carcinoma (3/10) compondo 30,0% das amostras positivas e amostras de leucoplasias com displasias (5/10) representaram metade das amostras positivas para HPV. Amostras negativas para DNA viral em 44,4% (12/27) eram de carcinomas, 40,7% (11/27) eram leucoplasia com displasia e 14,8% (4/27) leucoplasia sem displasia.

Quanto a localização das amostras HPV- positivas: 2,7% (1/37) em mucosa jugal e língua, 8,1% (3/37) em lábio e as amostras HPV-positivas de rebordo alveolar (5/37) apresentaram-se em 13,5% do total de amostras. Amostras HPV-negativas

tinham a seguinte localização: 16,2% (6/37) em lábio e língua; 21,6% (8/37) em rebordo alveolar; 10,8% (4/37) em mucosa jugal e 2,7% (1/37) em assoalho bucal, arco palatoglossal e palato mole (Tabela 6).

Dos pacientes que apresentaram amostras HPV-positivas 21,6% (8/37) eram do sexo masculino e 5,4% (2/37) eram do sexo feminino. Dentre os pacientes com amostras negativas para DNA viral, 54,0% (20/37) eram do sexo masculino e 18,9% (7/37) do sexo feminino (Tabela 6).

Quanto a faixa etária, 13,5% (5/37) dos participantes cujas amostras foram positivas para HPV tinham menos de 50 anos; 10,8% (4/37) de 50 anos a 69 anos e 2,7% (1/37) tinham 70 anos ou mais. Pacientes cujas amostras foram negativas tinham em 21,6% dos casos (8/37) menos de 50anos; 37,8% (14/37) de 50 anos a 69 anos e 13,5% (5/37) tinham 70 anos ou mais (Tabela 6).

Dentre os pacientes cujas amostras foram HPV-positivas, 22,2% (8/36) e 13,5% (5/37) faziam uso de tabaco e consumiam álcool, respectivamente. Pacientes com amostras negativas para DNA viral em 36,1% (13/36) dos casos eram fumantes e em 35,1% (13/37) ingeriam bebida alcoólica (Tabela 6).

Tabela 6 – Positividade para detecção do HPV nos participantes da pesquisa, segundo sexo, idade, local da lesão, uso de tabaco e ingestão de álcool, em Campo Grande –MS, 2021.

Variáveis	HPV– positivo		HPV - negativo		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Tipo de lesão						
Leucoplasia sem displasia	2	5,4	4	10,8		
Leucoplasia com displasia	5	13,5	11	29,7		
Carcinoma epidermoide	3	8,1	12	32,4		
Total	10	27,0	27	73,0	37	100,0
Sexo						
Masculino	8	21,6	20	54,0		
Feminino	2	5,4	7	18,9		
Total	10	27,0	27	73,0	37	100,0
Idade						
<50 anos	5	13,5	8	21,6		
50 a 69 anos	4	10,8	14	37,8		
>69 anos	1	2,7	5	13,5		
Total	10	27,0	27	73,0	37	100,0
Local da Lesão						
Lábio	3	8,1	6	16,2		
Língua	1	2,7	6	16,2		
Rebordo alveolar	5	13,5	8	21,6		
Mucosa jugal	1	2,7	4	10,8		
Assoalho bucal	-	-	1	2,7		
Palato mole	-	-	1	2,7		
Arco palatoglossal	-	-	1	2,7		
Total	10	27,0	27	73,0	37	100,0
Uso Tabaco *						
Sim	8	22,2	13	36,1		
Não	2	5,6	13	36,1		
Total	10	27,0	26	73,0	36	100,0
Ingestão Álcool						
Sim	5	13,5	13	35,1		
Não	5	13,5	14	37,8		
Total	10	27,0	27	13,0	37	100,0

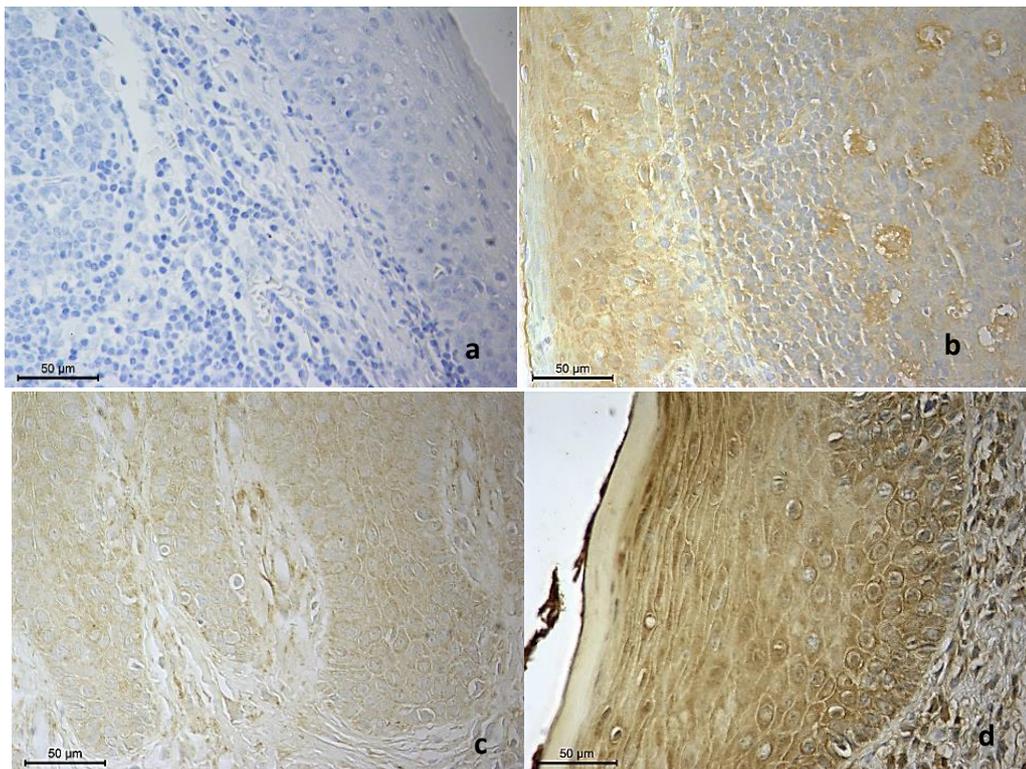
Nº: Número de amostras; %: Porcentagem, *1 paciente não respondeu.

5.4 Análise imuno-histoquímica

5.4.1 Expressão de p16

Na análise da imunomarcção por anticorpo anti-p16 as amostras foram classificadas em p16-positivas ou p16-negativas de acordo com as recomendações do LAST consensus (DARRAGH et al, 2012). Foram consideradas como amostras positivas para p16 as que apresentaram pelo menos 1/3 do epitélio (preferencialmente inferior) marcado de forma difusa com intensidade moderada ou acentuada. Os demais padrões de marcação foram considerados negativos (Figura 11).

Figura 11 – Padrão de expressão de p16 detectada por IHQ em tonsila humana e biópsia da lesão em mucosa oral de participantes da pesquisa, em Campo Grande – MS, 2021.



Nota: a: controle (-) tonsila humana – omissão do anticorpo primário; b: controle (+) - tonsila humana marcada com anticorpo anti-p16 na coloração marrom; c: amostra p16-negativa (marcada de forma multifocal em castanho) e d: amostras p16- positiva (marcada de forma difusa em marrom). Todas as figuras (400x)

Tabela 7 – Distribuição dos pacientes participantes da pesquisa de acordo com a expressão de p16 segundo tipo de lesão e positividade HPV na mucosa oral, Campo Grande, MS – 2021(n=37).

Variáveis	P16				TOTAL	X ²	P		
	Positivo		Negativo						
	N°	%	N°	%					
Tipo de Lesão	Leucoplasia sem displasia	1	2,7	5	13,5	6	16,2	4,744	0,093
	Leucoplasia com displasia	10	27,0	6	16,2	16	43,2		
	Carcinoma Epidermoide	10	27,0	5	13,5	15	40,5		
HPV	Positivo	7	18,9	3	8,1	10	27,0	0,979	0,322
	Negativo	13	35,1	14	37,8	27	73,0		

N°: Número de amostras; %: Porcentagem; X²: Teste Qui-quadrado de Pearson; $p < 0,05$.

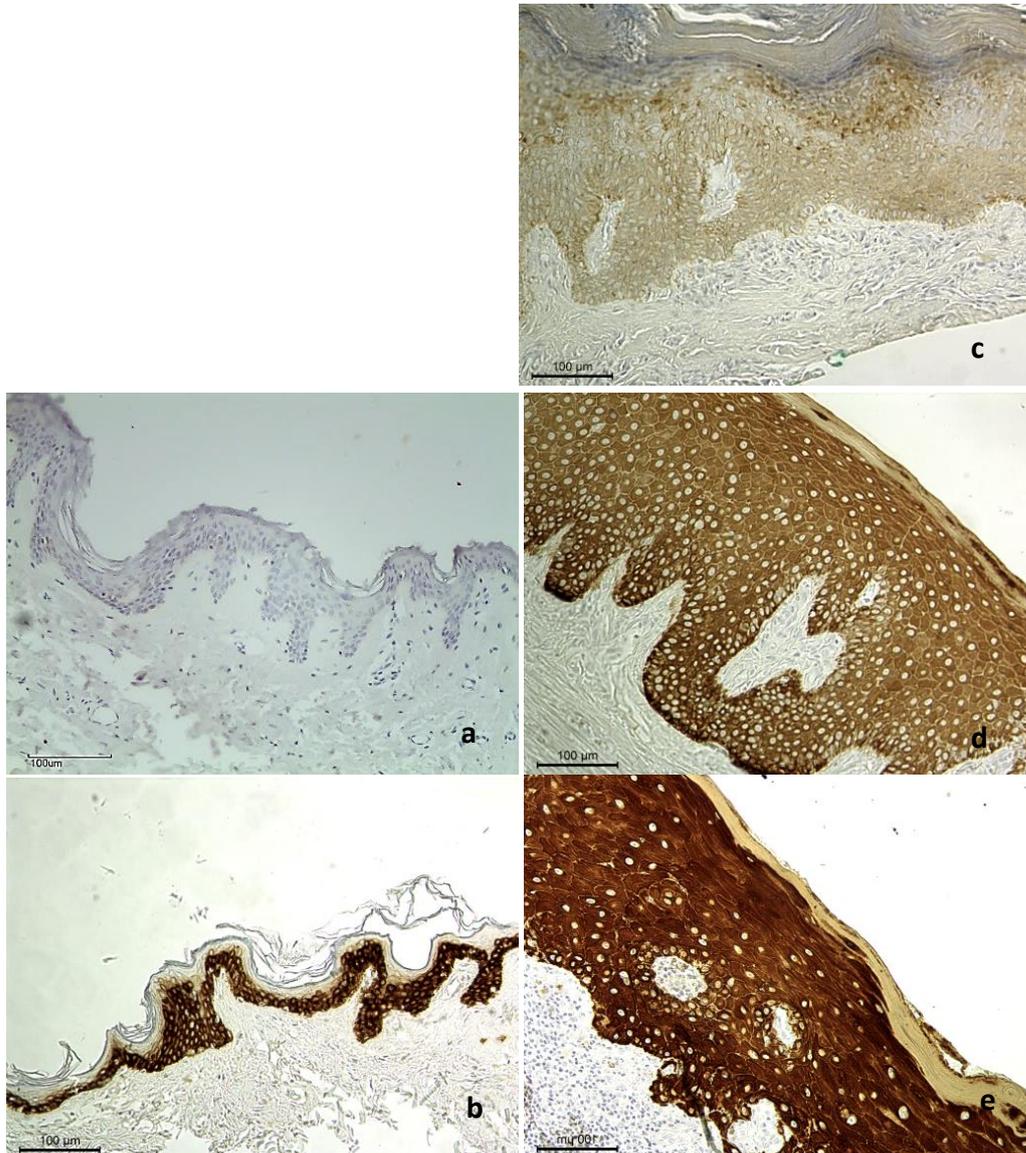
Na comparação entre os grupos de lesões e a positividade para p16 (teste Qui-quadrado de Pearson, $p < 0,05$), não houve diferença significativa entre os grupos analisados ($p = 0,093$). Na comparação entre amostra HPV-positivas e HPV-negativas para positividade para p16 também não houve diferença significativa ($p = 0,322$) entre os grupos com presença e ausência de DNA viral (Tabela 7).

5.4.2 Expressão de CK14 e CK19.

Os achados imuno-histoquímicos para as reações de CK14 e CK19 foram classificados de acordo com Okada; Moride (2010), Mikami et al. (2015), Santoro et al. (2015) quanto à distribuição ao longo das camadas epiteliais em basal ou difusa em diversas camadas epiteliais; e quanto a intensidade de marcação em discreta (coloração acastanhado), moderada (coloração marrom), acentuada (coloração marrom escura) ou negativa na ausência de qualquer célula epitelial marcada (Figura 12).

Na Figura 12, observa-se a expressão de CK 14 em pele humana e em biópsia de lesão da mucosa oral de acordo com a localização e intensidade da marcação.

Figura 12 – Padrão de expressão de CK14 detectada por IHQ em pele humana e biópsia da lesão em cavidade oral de pacientes que participaram da pesquisa – Campo Grande – MS, 2021.



Nota: a: controle (-) pele humana – omissão do anticorpo primário; b: controle (+) epiderme em pele humana marcada com anticorpo anti-CK14 na coloração marrom; c: amostra marcada com anticorpo anti-CK14 de forma difusa e discreta (marrom claro); d: amostra marcada com anticorpo anti-CK14 de forma difusa e moderada (marrom); e: amostra marcada com anticorpo anti-CK14 de forma difusa e acentuada (marrom escura). Todas as figuras (200x).

A distribuição das amostras marcadas por anticorpo anti-CK14 em relação ao tipo de lesão e detecção de DNA de HPV está demonstrada na Tabela 8.

Tabela 8 –Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com a expressão de CK14 nas camadas epiteliais segundo tipo de lesão e positividade para HPV na mucosa oral, Campo Grande, MS – 2021 (n=37).

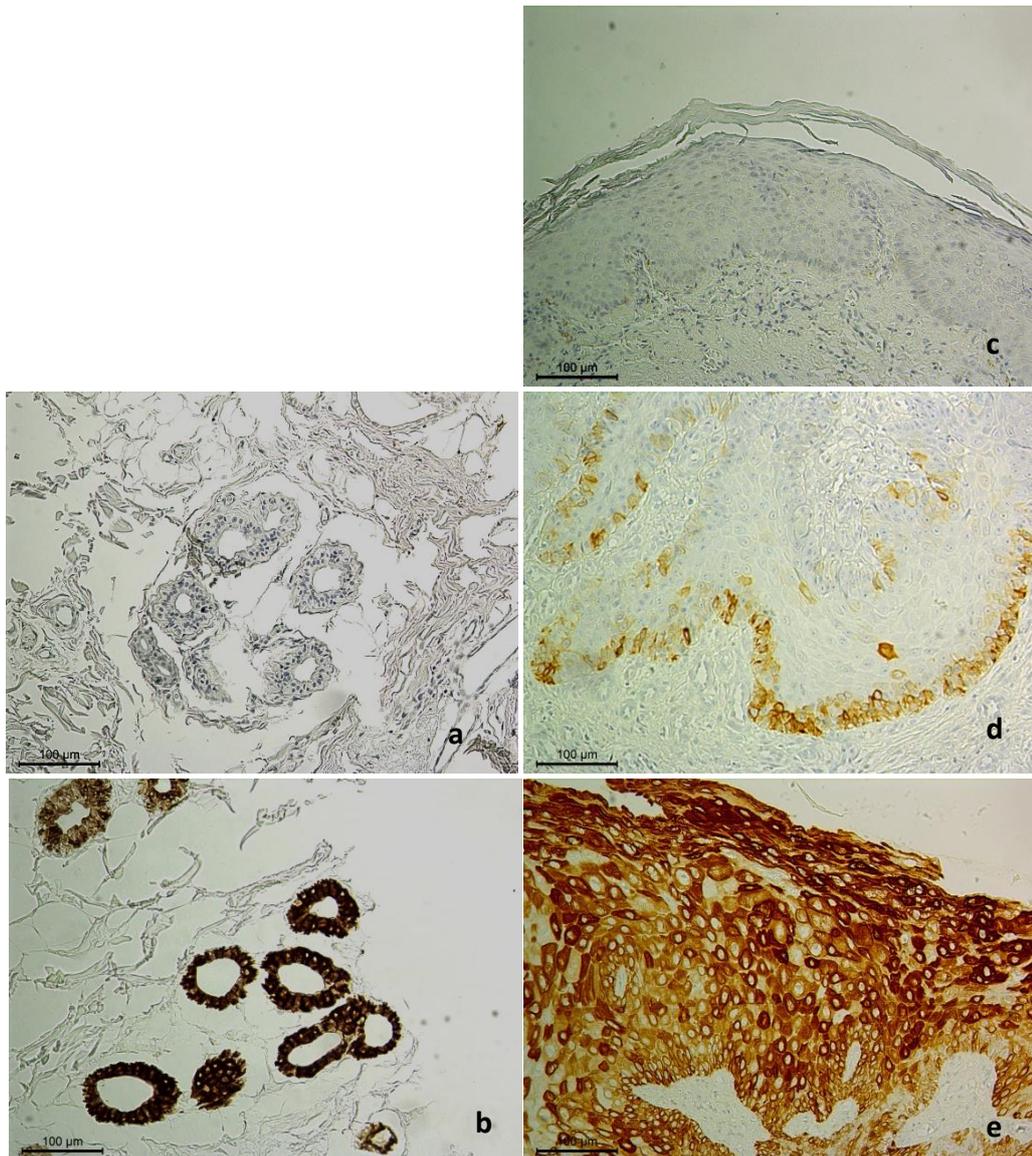
Variáveis	CK14						TOTAL	X ²	P		
	Difusa Discreta		Difusa Moderada		Difusa Acentuada						
	N°	%	N°	%	N°	%					
Tipo de Lesão	Leucoplasia sem displasia	3	8,1	1	2,7 ^a	2	5,4	6	16,2	12,364	0,015*
	Leucoplasia com displasia	6	16,2	10	27,0	0	0,0	16	43,2		
	Carcinoma Epidermoide	6	16,2	9	24,3	0	0,0	15	40,5		
HPV	Positivo	5	13,5	5	13,5	0	0,0	10	27,0	1,085	0,581
	Negativo	10	27,0	15	40,5	2	5,4	27	73,0		

N°: Número de amostras; %: Porcentagem; X²: Teste Qui-quadrado de Pearson; $p < 0,05$; a: indica uma categoria que difere significativamente das demais $p < 0,05$; * diferença significativa ($p < 0,05$).

Na comparação entre os grupos de lesões e a intensidade de marcação epitelial com anticorpo anti-CK14 houve diferença significativa (teste Qui-quadrado de Pearson, $p < 0,05$) na marcação difusa moderada entre amostras de leucoplasia sem displasia e as demais amostras. A diferença estatística foi significativamente menor ($p = 0,015$) nas amostras de leucoplasia sem displasia em relação aos grupos de leucoplasia com displasia e carcinoma epidermoide. Não houve diferença estatística ($p = 0,581$) na comparação das marcações difusas discreta, moderada ou acentuada em relação a positividade ou ausência de HPV nas amostras analisadas (teste Qui-quadrado de Pearson, $p > 0,05$).

Na Figura 13, observa-se a expressão de CK 19 em pele humana e em biópsia de lesão da mucosa oral de acordo com a distribuição da marcação nas camadas epiteliais.

Figura 13 – Padrão de expressão de CK19 detectada por IHQ em pele humana e biópsia da lesão em cavidade oral de pacientes que participaram da pesquisa – Campo Grande – MS, 2021.



Nota: a: controle (-) glândula sudorípara em pele humana – omissão do anticorpo primário; b: controle (+) glândula sudorípara em pele humana marcada com anticorpo anti-CK19 na coloração marrom; c: amostra negativa para marcação com anticorpo anti-CK19; d: amostra marcada com anticorpo anti-CK19 na camada basal em marrom; e: amostra marcada com anticorpo anti-CK19 de forma difusa em várias camadas epiteliais. Todas as figuras (200x).

Tabela 9 –Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com a expressão de CK19 nas camadas epiteliais segundo tipo de lesão e positividade para HPV na mucosa oral, Campo Grande, MS – 2021(n=37).

Variáveis		CK19						TOTAL	X ²	P	
		Negativa		Camada Basal		Difusa em várias camadas					
		N°	%	N°	%	N°	%				
Tipo de Lesão	Leucoplasia sem displasia	6	16,2	0	0,0	0	0,0	6	16,2	28,783	0,001*
	Leucoplasia com displasia	6	16,2	9	24,3*	1	2,7	16	43,2		
	Carcinoma Epidermoide	3	8,1*	1	2,7	11	29,7*	15	40,5		
HPV	Positivo	4	10,8	3	8,1	3	8,1	10	27,0	0,071	0,965
	Negativo	11	29,7	7	18,9	9	24,3	27	73,0		

N°: Número de amostras; %: Porcentagem; X²: Teste Qui-quadrado de Pearson; $p < 0,05$; *: indica que as categorias diferem significativamente $p < 0,001$.

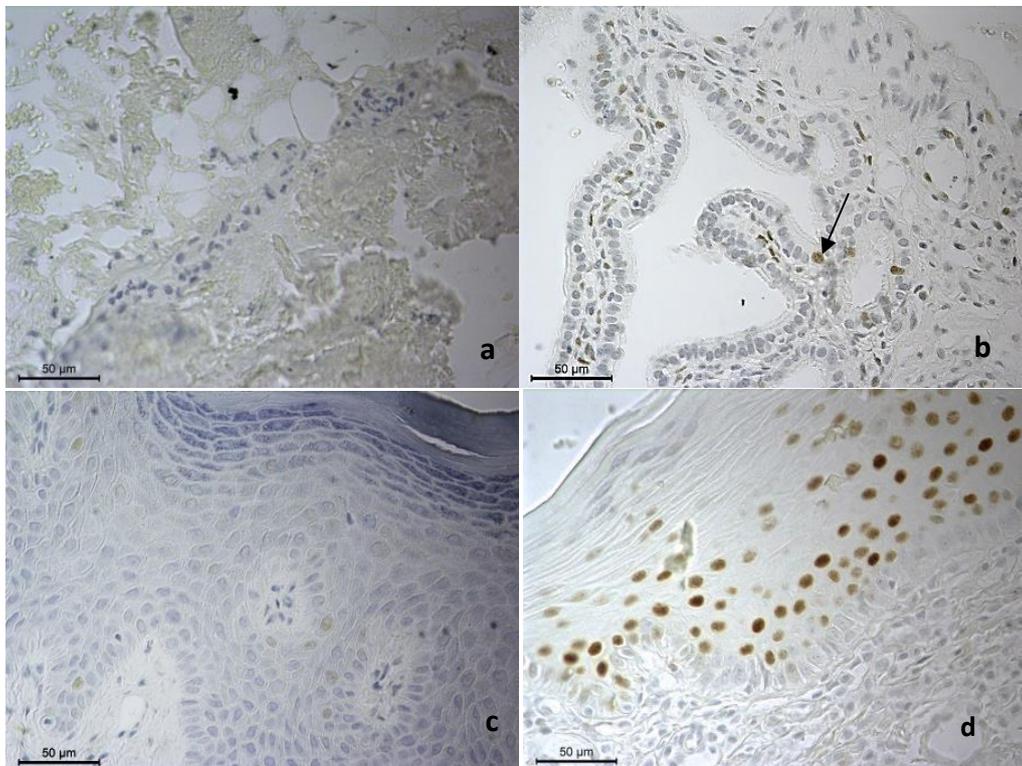
Na comparação entre os grupos de lesões e o tipo de expressão de CK19 ou sua ausência houve diferença significativas entre si (teste Qui-quadrado de Pearson, $p < 0,001$), sendo que no grupo de amostras de carcinoma foi significativamente menor o número de amostras negativas em relação aos grupos de leucoplasias. A marcação na camada basal foi significativamente maior ($p < 0,001$) no grupo de leucoplasia com displasia. A marcação difusa em várias camadas epiteliais foi significativamente maior ($p < 0,001$) no grupo de carcinoma epidermoide em relação aos grupos de leucoplasia. Não houve diferença significativa ($p = 0,965$) entre o padrão epitelial de expressão de CK19 ou negatividade para o marcador entre as amostras HPV- positivas e HPV- negativas analisadas (teste Qui-quadrado de Pearson, $p > 0,05$) (Tabela 9).

5.4.3. Expressão de p21 e ki67

Na análise imuno-histoquímica foi observada a marcação nuclear na reação por anticorpo anti-ki67 e anti-p21 realizou-se a contagem das células com marcação nuclear, obtendo-se a média dos 10 campos fotodocumentados.

Na Figura 14, observa-se a expressão de p21 em câncer cervical e em biópsia de lesão da mucosa oral.

Figura 14 – Padrão de expressão de p21 detectada por IHQ em câncer cervical e biópsia da lesão em cavidade oral de pacientes que participaram da pesquisa– Campo Grande – MS, 2021.



Nota: a: controle (-) – câncer cervical – omissão do anticorpo primário; b: controle (+) câncer cervical núcleos marcados com anticorpo anti-p21 na coloração marrom (seta); c: amostra negativa para a marcação; d: amostra tecido epitelial cujos núcleos marcados com anticorpo anti-p21. Todas as figuras (400x).

Na tabela 10 observa-se a análise estatística das médias da contagem de células com marcação nuclear com anticorpo anti-p21, segundo tipo de lesão e positividade para HPV na mucosa oral pelo teste ANOVA pós-teste Student- Newman-keuls ($p < 0,05$).

Tabela 10 – Médias da contagem de células com marcação nuclear por anticorpo anti-p21, segundo tipo de lesão e positividade para HPV na mucosa oral, Campo Grande, MS – 2021(n=37).

Variáveis		Média células (mm ²) ± Erro padrão	P
Tipo Lesão	Leucoplasia sem displasia	134,28±53,32	0,001*
	Leucoplasia com displasia	395,11±32,65	
	Carcinoma Epidermoide	509,34±33,72	
HPV	Positivo	331,42±42,99	0,063
	Negativo	425,42±26,22	

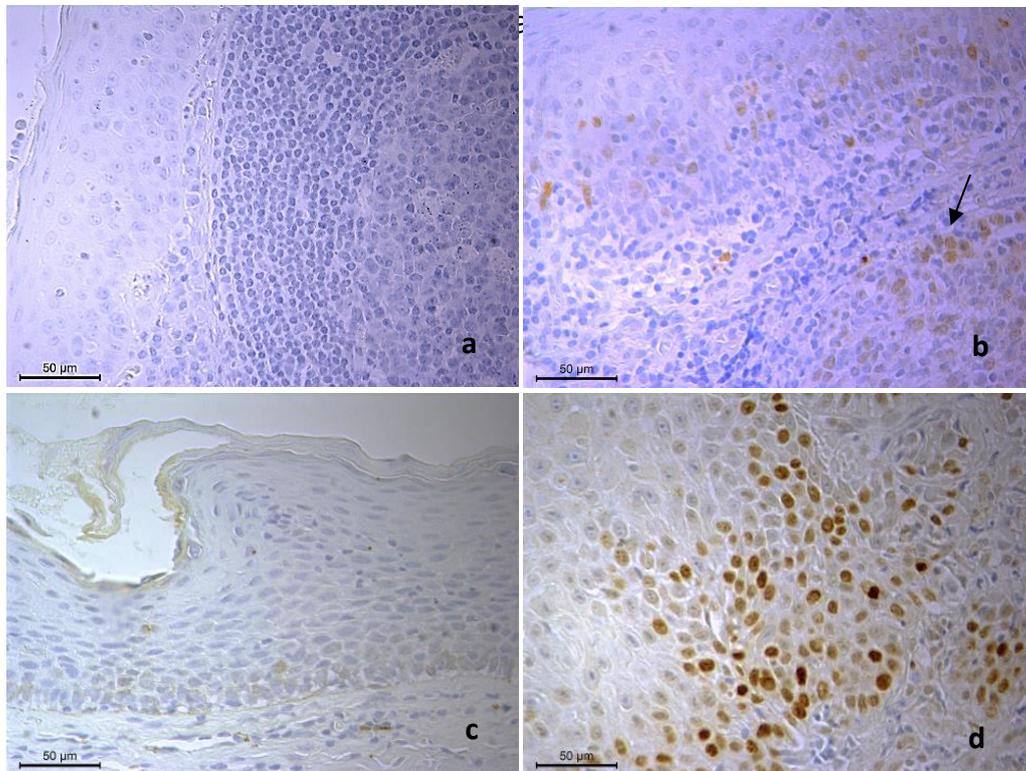
Na comparação entre os grupos de lesões em relação a média de contagem

N^o: Número de amostras; %: Porcentagem; p - teste ANOVA pós-teste Student- Newman-keuls (p<0,05); * diferença significativa (p<0,001).

de célula com núcleo marcado por anticorpo anti-p21 houve diferença significativa entre eles (teste ANOVA pós-teste Student-Newman-keuls - p<0,001), sendo que a média de células contadas no grupo de amostras de leucoplasia sem displasia foi significativamente menor do que as observadas no grupo de leucoplasia com displasia e também esta foi significativamente menor do que a média do grupo de carcinoma epidermoide. Não houve diferença significativa (p=0,063) pelo teste ANOVA pós-teste Student-Newman-keuls (p>0,05) entre amostras HPV-positivas e HPV-negativas na comparação das médias da contagem de núcleos marcados com p21.

Na Figura 15, observa-se a expressão de ki67 em tonsila humana e em biópsia de lesão da mucosa oral.

Figura 15 – Padrão de expressão de ki67 detectada por IHQ em tonsila humana e em biópsia de lesão da mucosa oral de pacientes que participaram da pesquisa – Campo Grande – MS, 2021.



Nota: a: controle (-) tonsila humana – omissão do anticorpo primário; b: controle (+) tonsila humana marcada com anticorpo anti-ki67 na coloração marrom (seta); c: amostra negativa para a expressão de ki67; d: amostra com marcação nuclear por anticorpo anti-ki67. Todas as figuras (400x).

Na tabela 11 observa-se a análise estatística das médias da contagem de células com marcação nuclear para Ki67, segundo tipo de lesão e positividade para HPV na mucosa oral pelo teste ANOVA pós-teste Student- Newman-keuls ($p < 0,05$).

Tabela 11 – Médias da contagem de células com marcação nuclear para ki67, segundo tipo de lesão e positividade HPV na mucosa oral, Campo Grande, MS – 2021 (n=37).

Variáveis		Média células (mm ²) ± Erro padrão	P
Tipo Lesão	Leucoplasia sem displasia	347,14 ± 51,06	0,169
	Leucoplasia com displasia	440,31 ± 49,46	
	Carcinoma Epidermoide	307,93 ± 51,06	
HPV	Positivo	709,53 ± 58,30	0,001*
	Negativo	231,95 ± 35,55	

N°: Número de amostras; %: Porcentagem; p – teste ANOVA, pós-teste Student- Newman-Keuls (p<0,05); *diferença significativa (p<0,001).

Na comparação das médias de contagem de célula com núcleo marcado por ki67 entre os grupos de lesões não houve diferença significativas entre eles (teste ANOVA pós-teste Student-Newman-keuls - p>0,05). Houve diferença significativa (p<0,001) entre as médias de contagem de célula com núcleo marcado por ki67 entre os grupos de amostras HPV-positivas e negativas, sendo a média maior em amostras positivas para DNA viral.

6 DISCUSSÃO

Este estudo visou avaliar nas leucoplasias e carcinoma epidermoide da cavidade oral, através de imuno-histoquímica, a relação entre a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular como a p16 e p21, da proteína Ki67 e de citoqueratinas tais como CK14 e CK19, com a presença do *Papilomavirus humano* (HPV) detectado por técnica de biologia molecular (PCR) em localidades da cavidade oral dos pacientes que foram clinicamente diagnosticados com estas lesões.

A leucoplasia oral é uma lesão precursora que possui características clínicas não vinculadas a um diagnóstico anatomopatológico específico, mas que indica um potencial neoplásico, já que a frequência de transformação neoplásica é maior do que o risco associado a uma mucosa normal (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016). A relação entre o aspecto clínico e as características histopatológicas indicam a complexidade na avaliação do grau de diferenciação celular, podendo-se encontrar hiperqueratose com ausência de displasia epitelial, displasia de discreta a severa ou mesmo guardar características neoplásicas de um carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo (RODRIGUES et al., 2000).

Considerando-se que os fatores de risco para a leucoplasia oral são os mesmos que estão envolvidos no desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral (CEO) com evidente associação entre estas lesões (RAMOS et al., 2017), propôs-se neste estudo esclarecer o envolvimento do HPV e de fatores socio-epidemiológicos relacionados ao surgimento da lesão precursora e neoplásica propriamente dita.

O perfil dos pacientes participantes da pesquisa quanto as características sócio-epidemiológicas foi predominantemente de pacientes do sexo masculino (75,7%), declarando-se pretos (35,1%) ou pardos (32,4%) com faixa etária de 35 a 84 anos e a média de idade de 56 anos; com baixa escolaridade, sendo que 56,8% dos pacientes haviam concluído o ensino fundamental ou apresentavam ensino fundamental incompleto.

O envolvimento do HPV em alguns tipos de lesões de cabeça e pescoço já está pré-estabelecido, como em câncer de orofaringe (BOGUÑÁ; CAPDEVILA; JANÉ-SALAS, 2019; HAEDICKE; IFTNER, 2013), mas sua possível associação com

surgimento de leucoplasias orais e carcinoma de boca ainda permanece em discussão. O HPV tem seu papel definido na carcinogênese por apresentar as oncoproteínas E6 e E7 que inativam proteínas supressoras tumorais como a p53 e a pRb que inativadas causam instabilidade genômica induzindo a malignização das células (ANTONSSON et al., 2015; MARUR et al., 2010; SIMONATO et al., 2016). Neste processo há uma perda da regulação do ciclo celular frequentemente observado em infecções persistentes por HPV de alto risco oncogênico (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

No presente trabalho foi demonstrada uma frequência de detecção de DNA de HPV por PCR em 27,0 % dos pacientes em que foram coletadas amostras de carcinoma e leucoplasia. Metade das amostras que foram positivas para DNA viral foram de leucoplasias com displasia e 30% das amostras eram de carcinomas orais. A menor frequência de detecção viral foi em amostras de leucoplasia sem displasia (20%). Embora o percentual de amostras de carcinoma tenha sido menor em relação a leucoplasia com displasia entre amostras positivas para HPV, a sua detecção em amostras com displasia pode ser um indicativo de uma possível interação com outros fatores e aumento do potencial de transformação maligna nestas lesões.

O HPV de alto risco oncogênico já foi identificado tanto em leucoplasias como em carcinomas da cavidade oral, havendo diferenças nos índices de detecção viral entre estes dois tipos de lesão e também foram diferentes entre as leucoplasias em relação ao grau de displasia ou nas lesões sem displasia, parece que a infecção por HPV desempenha um papel importante como fator de risco em lesões pré-cancerosas da mucosa oral e, portanto, nas lesões displásicas e na transformação maligna destas lesões (CAO et al., 2016; SANTACROSE et al., 2021).

Dados da literatura demonstram que a frequência de detecção do HPV pode variar de 38% até 100% em carcinomas epidermóides de boca e de 0% a 9,1% nas lesões leucoplásticas e que frequências menores aparecem quando o grau de displasia é menor ou em amostras de leucoplasia que não apresentam displasia (CALEY et al., 2015; MC CORD et al., 2013; SUNDBERG et al., 2019).

No entanto, a frequência de detecção de HPV de alto risco oncogênico pode chegar a 91% em casos de leucoplasia com displasias, tanto por método de Hibridização *in situ* como no PCR/RFLP (LERMAN et al., 2017). Em um estudo que utilizou o Ensaio Imunoenzimático (EIA), 75% dos carcinomas foram positivos para

HPV de alto risco oncogênico (CALEY *et al.*, 2015). Isto sugere que o HPV tem uma participação importante na carcinogênese oral já que o vírus identificado tem alto potencial oncogênico podendo ser determinante na carcinogênese em atuação sinérgica com outros fatores de risco como o álcool e tabaco (SANTACROSE *et al.*, 2021).

Foi observado neste estudo que metade das amostras positivas para detecção viral foram de pacientes que tinham menos de 50 anos e apenas 10% estava acima de 70 anos, podendo-se notar que maiores índices de infecção por HPV são encontrados em pacientes mais jovens. Na população ocidental, 15 a 20% dos pacientes com carcinomas orais estão relacionados à genótipos de HPV de alto risco sendo que os pacientes são jovens, homens brancos, com comportamento sexual apresentando múltiplos parceiros (BIXOFIS *et al.*, 2014).

No entanto, em um estudo com casos de carcinoma epidermoide de língua e assoalho de boca, Sobral *et al.* (2014) identificaram HPV de alto risco em pacientes do sexo masculino, não-tabagistas, com faixa etária acima de 60 anos. Médias de idade superior também foram observadas, em torno de 55 a 58 anos, nos trabalhos de Mc Cord *et al.*, 2013; Caley *et al.*, 2015; Lerman *et al.*, 2017; Sundberg *et al.*, 2019, sendo que 85% a 100% de tumores da cavidade oral HPV-positivos foram detectados em indivíduos com mais de 60 anos.

Dados da literatura demonstram que a leucoplasia oral em geral atinge indivíduos acima dos 40 anos, entre a quinta e sétima décadas de vida, sendo que a prevalência aumenta rapidamente com a idade (FARENZENA *et al.*, 2012; NEVILLE *et al.*, 2009; PARLATESCU *et al.* 2014). Pode-se também considerar o fato de que a lesão cancerígena leva mais tempo a se desenvolver e que a infecção por HPV pode ocorrer anos antes e causar inicialmente, no paciente em idade mais jovem, uma leucoplasia que, posteriormente, ao longo do tempo, sofre transformação neoplásica.

Assim, torna-se evidente que as lesões tendem a aumentar com o avançar da idade e principalmente, entre a quinta e sexta década de vida. Existe também uma maior prevalência de transformação maligna associada a pacientes idosos podendo ser explicada por um longo período de exposição da leucoplasia a fatores de risco (AMAGASA; YAMASHIRO; ISHIKAWA, 2012; SOBRAL *et al.*, 2014; WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016)

A identificação viral em pacientes com as lesões em estudo, sofre influência de diversos fatores que devem ser avaliados a fim de obter uma análise mais precisa e completa. As diferenças nas frequências de detecção do HPV podem ser explicadas por características epidemiológicas dos pacientes, sítios anatômicos das lesões e metodologias empregadas na identificação viral; a técnica de coleta, o tipo e origem do material biológico utilizado nas pesquisas (SIMONATO et al., 2016; SOBRAL et al. 2014).

Há uma variação na detecção de HPVs na mucosa normal da cavidade bucal e orofaringe, de 5 a 12%, dependendo da técnica utilizada (SANTACROSE et al., 2021). Em um estudo realizado em Campo Grande – MS, em cavidade oral normal de adultos que faziam uso de prótese dentária ou não, houve uma prevalência de 27,7% de detecção de HPV (NASCIMENTO et al., 2019), muito similar a frequência encontrada em nossas amostras (27,0%).

É preciso então considerar as condições epidemiológicas como a região geográfica, raça, sexo, idade, localização da lesão, hábitos como uso de tabaco e consumo de bebida alcoólica e comportamento sexual como determinantes para a presença da infecção por HPV. Neste estudo 80% das amostras HPV-positivas foram de pacientes do sexo masculino, que também em 80% dos casos faziam uso do tabaco, sendo que metade as amostras HPV-positivas tinham como sítio anatômico rebordo alveolar cujo epitélio apresenta-se queratinizado devido ao atrito da mastigação, o que também pode propiciar a penetração viral nas camadas epiteliais mais profundas infectando as camadas basais. Observou-se também que metade dos pacientes com amostras positivas para HPV ingeriam bebida alcoólica.

Algumas regiões do mundo apresentam maior incidência de infecção pelo vírus, é o caso da China e Índia com prevalência de 46% no carcinoma epidemoide oral (CHAKROBARTY et al., 2014; ZHU; SCHUERCH; HUNT, 2015) em relação aos países europeus. Na Índia e Paquistão, a incidência de câncer oral em 2018 foi classificada entre os três principais tipos de câncer. Por outro lado, em países como Reino Unido houve baixa prevalência viral de 2% (LOPES et al., 2011) e nos Estados Unidos foi de 5,9% (LINGEN et al., 2013).

Na região central do Brasil, o HPV-16 e HPV-18 foram identificados em carcinomas de cavidade oral e orofaringe em um estudo retrospectivo de prevalência

(PETITO et al., 2017). Os HPV-16 e 18 têm sido identificados em algumas leucoplasias orais (RAMOS et al., 2017), porém, podem ser também encontrados em células normais do epitélio oral (NEVILLE et al., 2009). No estudo de Nascimento et al. (2019) em mucosa oral normal, houve maior frequência dos subtipos de HPV de baixo risco oncogênico 6 e 11, dentre os de alto risco oncogênico os subtipos 31 e 45 com baixa carga viral sugerindo a presença de doença subclínica ou infecção latente.

Parece haver uma correlação com fatores secundários como maus hábitos de higiene buccal, lesões causadas por traumas de próteses mal adaptadas e o aumento da susceptibilidade à infecção por HPV, além daquelas relacionadas ao comportamento sexual que são responsáveis pela transmissibilidade viral (SANTACROSE et al., 2021).

Neste estudo, verificou-se em relação ao comportamento sexual que os participantes da pesquisa apresentaram a média de idade da primeira relação sexual de 18,5 anos, com início da vida sexual antes ou até os 18 anos de idade em 70,4% (19/27) dos pacientes; que 56,8% eram casados e 24,3% eram solteiros e que 74,1% (20/27) dos pacientes tiveram apenas 1 parceiro sexual nos últimos dois anos, com uma média de 6,2 parceiros desde a primeira relação sexual. Em 68,7% (11/16) dos pacientes tiveram 6 parceiros ou menos, devendo-se considerar que a média de idade dos participantes da pesquisa foi de 56 anos, observando-se que algumas características não coincidem com o perfil de pacientes infectados por HPV que está relatado na literatura.

A infecção por HPV em pacientes com prótese total ou parcial também foi associada a prática de sexo oral no estudo de Nascimento et al. (2019), embora os subtipos virais identificados na maioria dos pacientes não eram de alto risco oncogênico. Na população deste estudo, pouco mais da metade (51,4%) dos participantes usavam prótese dentária.

Dentre as condições epidemiológicas e as práticas relacionadas ao comportamento sexual de risco para infecção por HPV, neste estudo, os pacientes em geral eram casados, pretos ou pardos, apresentando apenas um parceiro sexual nos últimos dois anos, não praticantes de sexo oral e embora não fizessem uso de preservativos a maioria sem histórico de IST. Os participantes desta pesquisa não tinham um perfil característico de pacientes infectados por HPV em regiões do ocidente (BIXOFIS et al., 2014).

A auto-inoculação ou transmissão por sexo oral deve ser considerada quando se discute a detecção viral principalmente nas amostras de leucoplasia com displasia e carcinoma oral com a presença de subtipos de alto risco oncogênico. Há um consenso de que o HPV-16 apresenta maior prevalência em lesões bucais sendo identificado em mais de 90% dos carcinomas de células escamosas da orofaringe, no entanto, também foram detectados os tipos HPV-18, 33, 52 e 58 em menor frequência em carcinomas de células escamosas orais e orofaríngeas (KREIMER, et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2020). Nas lesões genitais a relação entre os tipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico é muito bem estabelecida em que os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 são considerados de alto risco para o carcinoma cervical e os tipos 6, 11, 42, 44 de baixo risco e envolvidos na patogênese de lesões benignas (CASTRO et al., 2004).

Considerando-se que lesões displásicas presentes em leucoplasias orais apresentam características histopatológicas e dados demográficos semelhantes ao carcinoma de orofaringe HPV-positivo é possível que haja também um envolvimento viral em sua etiologia (LEE et al., 2000), havendo detecção exclusiva do HPV-16 em lesões que sofreram transformação neoplásica em tumores de cabeça e pescoço (PRIEGGE et al., 2017) com frequência elevada de 78,9% em amostras de leucoplasias (CRUZ et al., 1996).

Embora no presente trabalho, tanto as leucoplasias como carcinomas orais foram encontradas predominantemente em pacientes do sexo masculino em acordo com descrições da literatura (FARENZENA et al., 2012; NEVILLE et al., 2009; PARLATESCU et al., 2014, MC CORD et al., 2013; CALEY et al., 2015; LERMAN et al., 2017), existe na literatura relatos em que o sexo feminino foi superior entre casos de leucoplasias e inferior entre casos de carcinoma epidermoide da cavidade oral (SUNDBERG et al., 2019).

Deve-se ressaltar que em casos de leucoplasia há um maior índice de malignização entre pacientes do sexo feminino (GISSI et al., 2018), homens com leucoplasia oral apresentam menores chances de sofrer transformação neoplásica, não havendo um fator determinante que explique este fato (PINTO et al., 2020). Alguns estudos a respeito da transformação neoplásica em leucoplasias definiram que há uma ampla faixa percentual para o fenômeno entre 0,13% e 34,0%, sendo a taxa

média de 3,5% (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016), como a etiologia do câncer é multifatorial assim os fatores mais diversos interferem no surgimento da lesão.

Quando se discute os fatores de risco para transformação malignada leucoplasia oral é importante ressaltar o envolvimento de algumas características. Numa revisão sistemática, em análise de 24 estudos, identificou-se que a localização da lesão, idade avançada, sexo feminino, tamanho da lesão (superior a 200 mm²), tipo não homogêneo de leucoplasia e os graus mais altos de displasia são elencados como determinantes no processo de transformação maligna, sendo os fatores que mais contribuíram para a malignização das leucoplasias orais (HOLMSTRUP et al., 2006; PINTO et al., 2020; SUNDBERG et al, 2019; VAN DER WAAL, 2009).

Alguns autores relataram que a leucoplasia na língua tem um risco 2,72 vezes maior para transformação maligna e na leucoplasia no assoalho da boca o risco é 1,84 vezes maior quando comparados com outras localizações na cavidade oral (LEE et al., 2006). Posteriormente, em outro estudo, houve 24,2% de prevalência de transformação maligna na leucoplasia de língua, seguida por 14,9% de prevalência em amostras de língua junto com assoalho da boca (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016). Pinto et al. (2020) também identificaram transformação maligna mais prevalente em leucoplasia na língua.

O sitio anatômico das lesões pode interferir na infecção por HPV, havendo uma tendência a infecção em algumas localidades sem o entendimento preciso do significado da influência do microambiente anatômico a propiciar a instalação viral. Quando se considera a relação entre localidade dos carcinomas orais e HPV, segundo alguns autores, a variação na incidência de infecção por HPV de alto risco oncogênico em tumores dos 2/3 anteriores da língua, assoalho bucal, rebordo alveolar, gengiva, mucosa bucal, labial e palato duro não tem permitido estabelecer uma correlação precisa entre os tumores destas localidades e o vírus (LOPES et al., 2011; MARTÍN-HERNÁN et al., 2013). Segundo Parise et al. (2000) em leucoplasias as maiores prevalências do HPV localizam-se em língua, mucosa jugal, palato duro, assoalho e gengiva.

Em amostras neste estudo, a localização das amostras HPV- positivas estavam em 10,0% em mucosa jugal e língua, 30,0% em lábio, sendo que metade da detecção viral ocorreu em rebordo alveolar, podendo-se associar a ausência de dentes na

região ao atrito da mastigação e microfissuras no tecido epitelial, o que facilita a penetração viral.

A localização geral das lesões coletadas no estudo mais frequentemente observada também foi em rebordo alveolar 35,1% (13/37), seguidas por lábio 24,3 % (9/37) e língua 18,9% (7/37). Estas localidades aparecem com maior incidência no caso das leucoplasias com displasia 18,9% (7/37) em rebordo alveolar, lábio 10,8% (4/37) e língua 5,4% (2/37), ressaltando que algumas destas regiões anatômicas apresentam segundo a literatura, maior risco de transformação neoplásica (VASCONCELOS et al., 2020). Por outro lado, as leucoplasias sem displasia estavam localizadas em 66,7% (4/6) dos casos em mucosa jugal, não havendo nenhum carcinoma nesta localidade. Os carcinomas coletados também estavam localizados na maior parte dos casos em lábio (33,3%), língua (33,3%) e em rebordo alveolar (26,7%). Segundo Moro et al. (2018) a localização anatômica do tumor apresenta associação significativa com índices de sobrevida, indivíduos com câncer de lábio apresentaram melhores percentuais se comparados aos piores índices encontrados em pacientes com câncer na orofaringe.

Torna-se evidente que a etiologia multifatorial das lesões em estudo leva a tantas variações na interação entre os fatores de risco a determinar o comportamento de malignidade das leucoplasias e carcinomas orais. Assim a análise detalhada dos demais fatores de riscos pode aclarar algumas questões relevantes e fundamentais nestas interações.

Cem por cento das respostas válidas foram negativas quanto ao uso de drogas ilícitas (36/36). No entanto, no âmbito geral dos pacientes que participaram da pesquisa em relação ao uso do tabaco, 58,4% responderam que tinham este hábito e 45,9% relataram o hábito da ingestão de álcool, podendo-se verificar que estes hábitos foram comuns, principalmente entre os pacientes que apresentavam carcinomas, em 60,0% e 66,7% dos casos faziam uso do tabaco e consumiam bebida alcoólica, respectivamente.

Menor frequência foi encontrada em pacientes com leucoplasia, sendo que menos da metade dos pacientes (31,8%) tinham o hábito da ingestão de bebida alcoólica. Foi possível verificar ambos os hábitos em 27,3% dos pacientes com leucoplasia sendo também quase o dobro (53,3%) para pacientes com carcinomas.

Isto demonstra a relação do álcool e tabaco no desenvolvimento de lesões neoplásicas como já bem descrito na literatura (RAMOS et al., 2017).

Dentre os pacientes que apresentaram leucoplasia sem displasia o tabagismo estava presente em 8,3% (3/36) dos casos e em 25% (9 /36) dos casos de pacientes com leucoplasia com displasia, mesmo percentual para pacientes com carcinoma. Quanto ao consumo de álcool apenas 2,7% (1/37) dos pacientes com leucoplasia sem displasia ingeriam bebida alcoólica sendo maior a frequência (16,2%; 6/37) entre os que apresentavam leucoplasia com displasia e carcinoma (27%; 10/37), demonstrando o aumento da frequência de ambos os consumos na medida em que a leucoplasia progride para uma lesão displásica e neoplásica.

Sabe-se que o uso de tabaco e consumo de álcool são fatores envolvidos no desenvolvimento destas lesões, estejam isolados ou atuando em conjunto. Segundo Ramos et al. (2017), a maioria, se não todos os carcinomas orais são precedidos por um período em que epitélio apresenta displasia epitelial (NAPIER; SPEIGHT, 2008) que sob efeito sinérgico do tabaco e o álcool progridem para neoplasia. Sendo que estes fatores de risco estão entre os mais importantes no desenvolvimento das lesões, havendo assim uma maior incidência principalmente em pacientes fumantes.

O carcinoma epidermoide de boca está associado diretamente com o excesso do consumo de tabaco e álcool (OH et al., 2014; SIMONATO et al., 2016; RIVA et al., 2021), as substâncias liberadas pela fumaça do tabaco atuam como carcinógenos e imunossupressores, sendo que o risco é 30 vezes maior de desenvolvimento da neoplasia em fumantes e etilistas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2019). O álcool e os produtos contidos no tabaco atuam como promotores na carcinogênese uma vez que ocasionam a proliferação celular na célula iniciada e consequente crescimento tecidual (VINCENT; GATENBY, 2008).

Nesta pesquisa os resultados corroboram com estes dados apresentados na literatura podendo-se inferir o envolvimento do tabaco e álcool no desenvolvimento das lesões estudadas.

A avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos que possibilitam caracterizar a expressão de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular, proliferação e diferenciação celular nas lesões estudadas permitiu observar o comportamento celular nos diferentes tipos de lesões buscando sua associação com a presença do HPV.

Objetivou-se definir a viabilidade da utilização das proteínas estudadas como preditivos na rotina diagnóstica de lesões HPV-positivas, isoladamente ou em conjunto com a técnica de detecção do DNA viral por biologia molecular.

A p16 tem sua expressão aumentada em altos níveis em células infectadas por HR-HPV, tais como os tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70 em amostras de câncer de cabeça e pescoço; e frequentemente, perde expressão em tumores negativos para HPV (EZE; LO; BURTNESS, 2017). Ocorre o aumento da expressão de p16 especialmente em tumores da orofaringe, considerado por alguns autores com valor preditivo para infecção por HPV nestas lesões (ALÓ et al., 2021; SRITIPPHO; CHOTJUMLONG; IAMAROON, 2015; ZHU; SCHUERCH; HUNT, 2015). Há um acúmulo celular de p16 induzido por E7 do HPV (SYRJÄNEN, 2018). A proteína E7 do HPV-16, HPV-18 e HPV-31 apresenta promotores dependentes da diferenciação celular (RAUTAVA; SYRJÄNEN, 2011; MORGAN; MACDONALD, 2020). No entanto, até o presente, ainda não se conseguiu concluir a respeito do uso do marcador para lesões da cavidade oral com valor preditivo para a infecção por HPV.

Alguns estudos demonstraram em carcinomas da cavidade oral a relação entre a expressão da proteína p16 e a detecção do HPV de alto risco oncogênico (MC CORD et al., 2013; CALEY et al., 2015; LERMAN et al., 2017; SUNDBERG et al., 2019). Fato que já não foi observado de forma tão frequente nas leucoplasias orais, parecendo haver maior envolvimento viral em displasias acentuadas ou moderadas onde 27,5% de amostras foram p16-positivas (MC CORD et al., 2013). No trabalho de Sundberg et al. (2019) todos os pacientes com leucoplasias p16-positivos foram negativos para a detecção de HPV.

Neste estudo não houve diferença estatística ($p=0,093$) na positividade para p16 entre os grupos de lesões analisadas. Parece não haver relação entre o grau de malignidade da lesão e o aumento da expressão de p16, podendo-se inferir o envolvimento de outros fatores determinantes para a expressão desta proteína reguladora de ciclo celular. Os resultados obtidos quanto a expressão de p16 são conflitantes com dados existentes na literatura que demonstram uma tendência ao aumento da expressão da p16 com o aumento da malignidade da lesão (VASCONCELOS et al., 2020).

Segundo ALÓ et al. (2021) a ausência de diferenças significativas na expressão de p16 entre lesões pré-invasivas e carcinoma de células escamosas é um resultado esperado pois, em particular na orofaringe, sua expressão é preditiva em lesões relacionadas ao HPV, em ambos os tipos de lesão, não devendo ser considerado como um marcador para o diagnóstico diferencial de leucoplasias e carcinoma invasivo.

Pode-se explicar a frequência mais elevada da expressão da p16 em amostras positivas para o HPV já que na presença do vírus ocorre degradação de pRb pela oncoproteína E7 onde não se formam complexos E2F-Rb o que em última análise acarreta o aumento da expressão de p16 (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012; WITKIEWICZ et al., 2011). A p16 atua como um CDKI regulando de forma inibitória a progressão do ciclo celular por bloquear a fosforilação da pRB.

No entanto, neste estudo, não foi possível realizar a associação entre a expressão de p16 e presença de HPV já que não houve diferença estatística ($p=0,322$) entre amostras HPV-positivas e HPV-negativas quanto a positividade para p16, fato relatado em alguns estudos com leucoplasia e carcinoma oral (ABREU, P.M. de, 2015; SUNDBERG et al., 2019).

Quando se discute a especificidade da imunomarcagem com anticorpo anti-p16 em carcinoma oral mesmo podendo ser uma técnica auxiliar e sensível na infecção por HPV, estudos anteriores demonstram que a positividade da proteína p16 não é 100% específica. Segundo Priegge et al (2017), a associação de testes de IHQ para p16 e PCR para DNA de HPV foi tão sensível quanto o uso da IHQ ou PCR isoladamente, mas significativamente mais específico que a utilização dos testes em separado. Pannone et al., 2012 demonstraram 100% de sensibilidade para o teste de p16 em casos de CEO relacionados ao HPV. Por outro lado, a taxa de especificidade de p16 foi de apenas 74%, sendo 26% de resultados falso-positivos. Dados de literatura ressaltam a importância da utilização de testes combinados a fim de aumentar a especificidade dos resultados com o objetivo de evitar que uma proporção de tumores seja relacionada ao HPV, quando apenas se utiliza a IHQ para p16, já que o teste apresenta alta sensibilidade (PRIEGGE et al., 2017).

Em alguns estudos, pesquisadores concluíram que a expressão de p16 não foi um indicador determinante da presença de HPV em leucoplasia e carcinoma oral e que um maior número de casos deveria ser analisado (ABREU, P.M. de, 2015;

SUNDBERG et al., 2019). Considera-se a possibilidade de que outras vias moleculares podem estar envolvidas na expressão aumentada da proteína p16 como por exemplo a inativação mutacional da pRB (MARUR et al., 2010).

Os resultados da análise estatística deste estudo, não puderam confirmar a viabilidade e importância de utilizar-se a IHQ para p16 em lesões positivas para HPV, mesmo em combinação com detecção viral por biologia molecular.

A fim de obter informações quanto status de diferenciação celular nas lesões neoplásicas e pré-neoplásicas realizou-se a análise da expressão de citoqueratinas, onde foi encontrada diferença estatística ($p < 0,001$) entre os grupos de lesões avaliadas e os tipos de marcação com anticorpo anti-CK19, demonstrando que os carcinomas apresentam em sua maioria uma marcação difusa em várias camadas e que as leucoplasias não apresentam a expressão tão intensa desta citoqueratina. Dentre as leucoplasias observou-se que houve marcação da camada basal em amostras com displasia, no entanto, amostras sem displasia foram predominantemente negativas para CK19.

Embora alguns autores tenham observado a expressão de CK19 em epitélio normal e hiperplásico apenas na camada basal (PRABAKARAN; MUTHUKRISHNAN, 2014) foi relatado nos estudos de Fillies et al. (2007); Saitoh et al. (2016) que não houve expressão de CK19 em regiões benignas ou hiperplásicas do epitélio oral queratinizado.

Safadi et al., (2020) observaram em displasia acentuada a expressão de CK19 apenas na camada basal e parabasal em epitélio queratinizado do assoalho da boca indicando que há peculiaridades do tecido epitelial em cada região da mucosa oral e que o caráter de malignidade das células displásicas justificam a expressão de CK19 mesmo em epitélio queratinizado. Por outro lado, dados de literatura indicam que a expressão de CK19 ocorre na transição ou transformação cancerígena com ampla expressão nos carcinomas epidermóides e marcação de camadas suprabasais em displasias moderadas e acentuadas, podendo-se observar que outros fatores do tecido epitelial em questão também são determinantes na expressão de CK19 (HANDAJANI; HANINDRIYO, 2018).

Prabakaran; Muthukrishnan (2014), em uma revisão sistemática, relataram também que a CK19 é um marcador de displasia moderada a acentuada e carcinoma

in situ no epitélio oral, sendo que nas displasias, a CK19 é expressa na região basal e camadas celulares suprabasais, corando fortemente por IHQ.

A expressão de CK19 na região suprabasal é acompanhada por um atraso na expressão de involucrina (SAFADI, et al., 2020) que indica um atraso na diferenciação celular permitindo considerar que a expressão suprabasal de CK19 indica aumento no potencial pré-maligno (JACQUES et al., 2009). Isto torna a imunocoloração por CK19 uma ferramenta válida para identificar células potencialmente malignas além de tornar as células displásicas mais visíveis.

A localização anatômica das lesões e as características epiteliais de cada região da mucosa oral influenciam na expressão das citoqueratinas (PARAMIO; JORCANO, 2002). Há diferenças entre fornx labial e gengiva já que esta última sofre efeito de forças mecânicas da mastigação e apresenta as células de Merkel, mecanorreceptores, marcados positivamente por CK 8 e 19, características desta região anatômica relacionadas a fisiologia da mastigação. Uma possível explicação é a diferenciação precoce de células epiteliais no epitélio hiperqueratinizado o que está associado negativamente a expressão de CK19 (VALASH et al., 2017).

Desta forma, há limitações do uso da imunocoloração por CK19 nas displasias pela sua expressão negativa na mucosa queratinizada, havendo uma relação inversa com o estado de queratinização do epitélio displásico, o que interfere na avaliação de sensibilidade e especificidade do teste IHQ para CK19 na detecção de alterações displásicas epiteliais já que foi encontrada cem por cento de negatividade em relação a expressão de CK19 nestas lesões (SAFADI, et al., 2020).

Houve alguma semelhança entre o epitélio gengival e leucoplasia, no que diz respeito na expressão basal de CK8 e expressão suprabasal das citoqueratinas 14 e 17 (MIKAMI et al., 2015; VALASH, et al., 2017). Ao considerar o fato de que a expressão basal de CK 19 pode ser fisiológica em epitélio oral (SAITOH et al., 2016; VALASH et al., 2017) caracteriza-se limitação diagnóstica do uso do marcador em tecidos epiteliais queratinizados (SAFADI et al., 2020).

Este fato também compromete o potencial para diagnóstico precoce do câncer oral nas leucoplasias, a depender da localidade da lesão, uma vez que nem sempre a expressão da CK19 pode ser relacionada às características de malignidade da

lesão. No entanto, o uso combinado com outros marcadores poderia ser útil como indicadores de malignidade e para definir prognóstico das lesões (TORRAS; ESCODA, 2015; YOSHIDA et al., 2015), fato também observado na análise das amostras desta pesquisa.

Em nosso estudo foi possível verificar uma influência da localidade da lesão e características de queratinização epitelial na expressão de CK19, onde as amostras de rebordo alveolar foram predominantemente negativas ou com marcação apenas na camada basal em 86,2% das amostras, fato que pode estar relacionados a maior queratinização do tecido epitelial nesta localidade. Por outro lado, 71,4% das amostras de lesões em língua (5/7) apresentaram-se com marcação difusa em diversas camadas epiteliais, como um indicativo de malignidade e/ou potencial neoplásico das lesões na mucosa da língua.

Segundo Valash et al. (2017), existe associação entre a expressão de CK19 e carcinomas de assoalho da boca quando comparado com carcinomas de outras regiões da mucosa oral, demonstrando desta maneira, que mesmo em epitélio com alterações neoplásicas a expressão da CK19 sofre influência de outros fatores locais.

Um aumento da expressão de citoqueratinas de baixo peso molecular como CK19 foi associado com displasia de alto grau e neoplasia intraepitelial escamosa da cérvix uterina e uma diminuição da taxa de sobrevivência de pacientes com o carcinoma epidermoide (FILLIES et al., 2006; YOSHIDA et al., 2015) havendo um indicativo do envolvimento do HPV na expressão de CK19.

Em um estudo inicial, Kellokoski et al. (1991) avaliaram por IHQ a distribuição das citoqueratinas em 96 biópsias da mucosa oral normal obtidas de mulheres com infecções genitais por HPV e observaram uma expressão de CK19 mais intensa na camada basal em amostras positivas para DNA do HPV. Em câncer de orofaringe com positividade para HR-HPV, Santoro et al. (2015) observaram em 100% dos casos, uma expressão constante de CK19 com coloração geralmente intensa e localização preferencialmente em camadas epiteliais superiores. Nas áreas perilesionais, com alterações pré-neoplásicas e áreas distantes do tumor infectadas com HR-HPV houve positividade para CK19, distribuída em todas as camadas epiteliais, mas principalmente na camada basal, com diferença estatística em relação as amostras de câncer negativas para HR-HPV.

No entanto, em nosso estudo, não houve diferença estatística ($p=0,965$) na expressão de CK19 entre amostras positivas e negativas para DNA viral, devendo-se levar em conta que outros fatores como características de malignidade das lesões ou localização na mucosa oral possam ter interferido e foram determinantes na expressão desta citoqueratina nas lesões estudadas.

Há também uma relação da expressão de algumas citoqueratinas como CKs 8, 18 e 19 (PRABAKARAN; MUTHUKRISHNAN, 2014) com o grau de malignidade dos carcinomas, sendo que aqueles pouco diferenciados com maior desregulação do ciclo celular tem sua expressão aumentada (SAITOH et al., 2016). Para alguns pesquisadores a CK19 tem envolvimento em aproximadamente 30% dos pacientes com carcinoma das células escamosas orais (ZHONG et al., 2007).

Outras citoqueratinas como CKs 1, 5, 6, 10 e 14 parecem ser expressas em tumores malignos bem diferenciados (SAITOH et al., 2016) com menor grau de malignidade e associadas a expressão de p21, stress hipóxico ou adesão celular (FROHWITTER et al., 2016).

Muito embora a CK14 tenha sua síntese restrita à camada basal do epitélio oral normal (SAITOH et al., 2016), pode também aparecer nas camadas celulares suprabasais inferiores pois permanece integrada no citoesqueleto mesmo quando as células saem do compartimento basal (FILLIES et al. 2006; PRABAKARAN; MUTHUKRISHNAN, 2014). Em leucoplasias foi demonstrada uma forte expressão suprabasal de CK14 no epitélio (VALASH et al., 2017).

Todas as amostras de leucoplasia e carcinoma que foram estudadas apresentaram marcação positiva para CK14 sendo difusa em todas as camadas epiteliais, mas com diferentes padrões de intensidade na marcação. Amostras de leucoplasia sem displasia foram as únicas que apresentaram marcação difusa acentuada, número pequeno de amostras ($n=2$) para inferir a associação desta citoqueratina com padrão mais intenso de expressão de CK14 em leucoplasias quando não há displasia.

Houve diferença significativa na comparação entre os tipos de lesões e a intensidade de marcação epitelial com CK14 sendo que a marcação difusa moderada foi significativamente menor ($p=0,015$) em leucoplasias sem displasia em relação a

leucoplasias com displasia e carcinoma, demonstrando uma tendência de aumento de expressão de CK14 a um grau moderado na medida em que houve o aumento do grau de malignidade das lesões. Há uma possível relação com o padrão de diferenciação celular uma vez que também já foi relatada na literatura a expressão desta citoqueratina em tumores malignos bem diferenciados (FROHWITTER et al., 2016).

Por outro lado, nos estudos de YOSHIDA et al., 2015 houve marcação por IHQ para CK14 na camada basal de epitélio de mucosa oral normal e em todas as camadas epiteliais na displasia epitelial discreta, no entanto, não encontraram correlação da CK14 com a malignização da lesão.

Um dos fatores a ser considerado é o sitio de localização da lesão podendo interferir na maior expressão da CK14. Segundo a literatura, em determinadas localidades da cavidade oral, ocorre a marcação positiva por CK14 em todas as camadas epiteliais em casos de carcinomas e leucoplasia com displasia ou não, havendo relação com o tipo epitelial de cada localidade da mucosa oral, o que foi descrito por Okada; Moride (2010) em amostras de língua com displasia e carcinoma.

Safadi et al. (2019) em um estudo com as citoqueratinas: 8, 10, 13, 14, 16, 18 e 19 para identificar parâmetros prognósticos clínicos e histopatológicos no carcinoma epidermoide de boca e orofaringe através de imuno-histoquímica detectaram aumento de expressão de CK19 em tumores com estágio mais avançado, com maior invasão tecidual e metástases, além de displasia epitelial adjacente e pior taxa de sobrevivência em 5 anos, enquanto que a CK14 teve menor associação com as metástases.

Estudos demonstram uma expressão suprabasal de CK14 em alta proporção em amostras de gengivas normais, sendo mais acentuada e presente em 70% das amostras de leucoplasia analisadas (VALASH et al., 2017). Na gengiva normal a expressão de alguns marcadores fenotípicos é semelhante ao epitélio anormal com presença de leucoplasia. Há uma plasticidade fenotípica do epitélio com base em requisitos do microambiente de cada local da mucosa oral, o que pode trazer uma limitação diagnóstica para lesões encontradas em determinadas localidades diminuindo a especificidade da expressão de CK14 em relação ao grau de malignidade da lesão.

Importante ressaltar que a reação de coloração por citoqueratinas como: CK13, CK17 e CK14 por si só não indica a presença ou ausência de neoplasia, uma vez que foi observada a expressão de CK14 em todas as camadas epiteliais em displasias e tumores orais (OKADA; MORIDE, 2010). Fato este que foi observado também nas amostras estudadas onde até mesmo leucoplasias sem displasia apresentaram marcação epitelial difusa em todas as camadas epiteliais, mas com menor intensidade de coloração, assim torna-se indispensável a associação de outras técnicas como critério de malignidade e o diagnóstico morfológico de rotina com H.E.

Nesta discussão relativa ao grau de malignidade dos carcinomas, há ainda dados controversos na literatura pois alguns estudos associam a maior expressão de CK19 em tumores orais pouco diferenciados (SAITOH et al., 2016), enquanto outros relatam terem observado uma maior expressão desta citoqueratina em tumores orais bem diferenciados (SAFADI et al., 2019), havendo controvérsia entre os autores. O mesmo ocorre para a expressão de CK 14 (YOSHIDA et al., 2015), parecendo haver duas vias patogênicas na expressão de citoqueratinas de baixo e alto peso molecular em carcinoma epidermóide oral (SANTORO et al., 2015). No entanto, o uso da CK19 mostrou-se confiável para determinar o grau de displasia epitelial e potencial de malignidade quando utilizado como adjuvante a outros testes (SAFADI, et al., 2020).

Embora tenha sido relatada uma associação entre expressão de citoqueratinas e a presença do HPV em amostras de leucoplasia e carcinomas por Santoro et al. (2015) e Cao et al. (2016), em nosso estudo, não houve diferença estatística ($p=0,581$) na expressão CK14 entre amostras positivas e negativas para DNA viral, podendo-se inferir que outras características que definem o padrão de diferenciação celular foram determinantes na expressão destas citoqueratinas nas lesões estudadas.

Neste trabalho foi possível considerar a expressão de CK19 como indicativo do aumento do potencial para malignidade da lesão já que houve diferença estatística entre os tipos de lesões e o padrão de expressão desta citoqueratina, no entanto, outros fatores como o sítio anatômico da lesão, grau de queratinização epitelial devem ser considerados como influenciadores da expressão epitelial desta citoqueratina.

Já a expressão de CK14 nas leucoplasias sem displasia apresentando-se estatisticamente menor ($p=0,015$), indicou uma tendência ao aumento da expressão da CK14 com o aumento do grau de displasia, parecendo que a intensidade de

marcação moderada está associada com menor grau de diferenciação celular e com malignidade.

A p21 atua como uma CDKI, levando à parada do ciclo celular e cessação da proliferação celular (ROMANOV; POSPELOV; POSPELOVA, 2012) inibindo a ciclina-D1-CDK4, está envolvida na regulação da transcrição, apoptose, em definir a dinâmica citoesquelética e motilidade celular, interfere na diferenciação, senescência e morte celular. A p21 tem atuação como reguladora citoplasmática da importação nuclear, interfere no reparo do DNA, onde o dano ao DNA leva à ativação da p53 induzindo ao aumento dos níveis de p21 e a parada na fase G1 conduzindo ao reparo ou apoptose (DUTTO et al, 2015).

Na análise da expressão da proteína reguladora de ciclo celular p21 foi possível notar um aumento na média de células contadas com imunomarcação por anticorpo anti-p21, de amostras de leucoplasia sem displasia para amostras de leucoplasia com displasia e carcinoma, havendo diferença significativa ($p=0,025$) entre os grupos de lesões analisados. Observou-se, neste estudo, que há uma relação entre a expressão de p21 e grau de malignidade das lesões. Parece haver uma atuação da p21 como oncogene nas lesões analisadas nesta pesquisa, com possíveis efeitos na diferenciação celular, inibição da apoptose, facilitando a migração e proliferação celular (ABELLA et al. 2010; ROMANOV; POSPELOV; POSPELOVA, 2012).

Segundo a literatura, a expressão de p21 em epitélio escamoso normal é descrita em células imaturas, basais e suprabasais, mais indiferenciadas (QUEIRÓZ et al., 2010). Em leucoplasias que apresentam displasias observa-se marcação nas camadas mais superiores ou diferenciadas do epitélio, em contraste com o epitélio normal onde não aparecem em células superficiais maduras.

Nossos achados corroboram com dados de literatura em que se demonstrou que em leucoplasias e carcinomas orais, há um aumento da expressão de p21 à medida que o grau de displasia aumenta. Entretanto, para alguns autores, em carcinomas a expressão é variável em áreas com células pouco diferenciadas (PÉREZ-SAYÁNS et al., 2013) podendo não haver diferença estatística entre epitélio normal e neoplásico (QUEIRÓZ et al., 2010).

Acredita-se que a ativação da p21 em lesões displásicas da cavidade oral seja o passo inicial para a transformação maligna em câncer oral. Chang et al. (2000) relataram expressão de p21 em 75% dos casos de leucoplasias verrucosas e 42% delas desenvolveram carcinomas, enquanto 26% apresentaram recorrência da lesão. Em outro estudo, Hogmo et al. (1998) identificaram uma positividade exacerbada da p21 associada em 80% dos casos a progressão de leucoplasias para carcinoma na cavidade oral. Estes dados de literatura ressaltam o envolvimento da p21 nas leucoplasias com displasias e permitem identificar a relação da proteína com a progressão neoplásica das displasias.

Na discussão do valor prognóstico da p21 em carcinoma oral, Mandú et al. (2015) demonstraram que a p21 pode ser considerada um marcador de prognóstico desfavorável em pacientes com carcinoma oral de alto grau enquanto outros marcadores como a p53 pode ser considerada de prognóstico favorável no carcinoma de baixo grau. A expressão da p21 ocorre de forma dependente ou independente da p53, estando nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, relacionada ao grau de diferenciação do tumor ou seja de forma independente da p53 (PÉREZ-SAYÁNS et al., 2013).

Levando-se em conta o grau de diferenciação celular e a expressão de citoqueratinas, dados de literatura demonstram que existe correlação entre expressão de citoqueratinas de alto peso molecular e a expressão de p21 mas que citoqueratinas de baixo peso molecular, como as que foram analisadas neste estudo, apresentam padrão oposto quanto à regulação do ciclo celular pela p21 (FROHWITTER et al., 2016; MEHRPOUYA et al., 2019), o que não foi observado em nossas amostras, já que tanto em marcação com CK14, CK19 e p21 o aumento da expressão relacionou-se com aumento do grau de displasia ou malignidade.

A proteína viral E7 do HPV é capaz de se ligar à p21 e revogar seu efeito inibitório (KUMAR et al., 2010; PÉREZ-SAYÁNS et al., 2013), carcinomas orais HPV-positivos estão relacionados ao prognóstico favorável (KIRITA; OMURA, 2015).

Neste trabalho não foi possível demonstrar a relação entre expressão de p21 na presença de DNA viral, já que não houve diferença significativa ($p=0,063$) entre amostras HPV-positivas quando comparadas a amostras negativas para detecção viral. Este achado está em acordo com o que foi demonstrado na literatura por Pérez-

Sayáns et al., (2013) que descartou a hipótese de que em carcinomas positivos para HPV estejam relacionadas ao controle dependente da p21.

Em relação a proteína ki67, não houve diferença significativa na comparação das medias de células contadas com núcleo marcado por Ki67 entre os grupos de lesões ($p=0,169$). Nossos resultados diferem daquele descritos na literatura que identificam a expressão de Ki67 relacionada a progressão displásica e as neoplasias.

Este evento foi observado por Jing et al. (2019); Wagner; Cardoso; Santos (2017) em um estudo em que compararam a expressão de Ki67 na mucosa oral normal, mucosa com displasia e carcinoma oral para avaliar o valor diagnóstico de Ki67. Os autores descobriram que a expressão do Ki67 era maior em carcinoma do que em tecidos não tumorais e que a expressão aumenta quando a displasia sofre progressão.

Alguns carcinomas a depender de seu grau de diferenciação celular guardam características proliferativas mais intensas (DRAGOMIR et al., 2012) e se relacionam com a maior expressão de Ki67, já existindo alguns que não apresentam uma taxa proliferativa tão grande por serem hipóxicos e autolimitantes, sua expressão em tumores benignos é considerada mediana (VÉNOKY et al., 2008). Para alguns autores, a alta expressão do Ki67 em pacientes com carcinoma oral tem relação com piores graus de diferenciação tumoral e maior índice de metástase em linfonodo (EL-MOFTY; PATIL, 2006; JING et al., 2019; KLIMOWICZ et al., 2012). A alta expressão de Ki67 em carcinomas orais além de estar associada a tumores pouco diferenciados representa piores índices de sobrevivência com um valor prognóstico independente e desfavorável (JING et al., 2019).

Condições locais da mucosa oral como características proliferativas do epitélio em determinadas regiões da cavidade oral (VALASH et al., 2017) podem influenciar a expressão de Ki67. Na cavidade oral normal, os autores observaram que células basais do epitélio da mucosa na região do fornix do lábio superior expressaram Ki67 em 75% das amostras analisadas e raramente observou-se expressão suprabasal do marcador. Da mesma maneira, observaram expressão de ki67 na camada basal de epitélio normal da gengiva. Já em pacientes com leucoplasia oral sem displasia, os autores observaram que houve um aumento de expressão de ki67 nas células epiteliais na camada basal e suprabasal especialmente na língua.

Em leucoplasia oral, dados de literatura demonstram a participação de ki67 e da p53 na carcinogênese demonstrando que um aumento na expressão de p53 e sua diminuição, combinada a alta expressão do Ki67, está significativamente relacionada à displasia e à transformação neoplásica da leucoplasia (SAITOH et al., 2016; GISSI et al., 2018).

Por outro lado, Kumar et al. (2010); Kumar; Kane; Rathod (2012) haviam encontrado um aumento na expressão de p53 e Ki67 relacionada ao grau de displasia, sugerindo que a co-expressão desses biomarcadores possa ser usada para identificar lesões com alto risco de transformação neoplásica. Wagner et al. (2016) demonstraram que a expressão do marcador de proliferação celular, Ki67, aumentou significativamente na leucoplasia que sofria transformação para carcinoma em relação a mucosa normal. Em 30 casos de leucoplasia oral com displasia que foram por eles estudados, havia uma correlação positiva entre expressão de Ki67 e gravidade da lesão (SINANOGLU; SOLUK-TEKKESIN; OLGAC, 2015; ALÓ, et al., 2021).

Assim é preciso especificar os fatores determinantes para um aumento de expressão de Ki67 na mucosa oral já que pode ocorrer de forma diversa nos tecidos epiteliais normais ou com alterações. Apesar da proteína Ki67 ser utilizada amplamente como marcador para lesões de maior grau de malignidade, ele apresentou baixa especificidade se comparado a outro marcador, a podoplanina, no estudo de Gissi et al (2018), em displasias presentes em leucoplasias orais.

Nesta pesquisa foi possível considerar como fator a determinar maior expressão de ki67, a presença do HPV. Houve diferença altamente significativa ($p=0,001$) na análise estatística quando se comparou as médias de contagem de células com núcleo marcado por anticorpo anti-Ki67, nas amostras HPV-positivas e HPV-negativas indicando que houve influência viral para o aumento da expressão desta proteína nas lesões em que foi encontrado o HPV.

Os resultados desta pesquisa são contraditórios aos demonstrados por Bu et al. (2016) em casos de câncer de orofaringe, onde o aumento da expressão de Ki67 é observada com mais frequência em tumores negativos para HPV e o marcador tem impacto significativamente desfavorável na sobrevida em pacientes sem recidiva.

Estudos demonstram que quando se considera a combinação de outros marcadores tumorais, Ki67 e p53 parecem ter valor prognóstico especialmente para os carcinomas invasivos (DRAGOMIR et al., 2012) enquanto que no epitélio displásico, o índice de positividade e a intensidade da reação para p16 apresentam-se maiores. Foi discutido, pelos autores, o valor da p16 na identificação de lesões displásicas e a importância preditiva de p53 e Ki67 como marcadores na identificação das formas agressivas de carcinomas orais, assim como, para avaliar o risco de transformação maligna na leucoplasia (KUMAR et al., 2010; WAGNER et al., 2016).

Nas amostras estudadas a expressão de Ki67 e p16 não foram significativamente diferentes na comparação de leucoplasias sem ou com displasias e carcinomas orais. Não foi possível demonstrar a eficácia da utilização destes marcadores no diagnóstico diferencial das leucoplasias e carcinomas nem mesmo o seu valor prognóstico quanto a malignidade das lesões.

Nossos resultados corroboram com os achados de Galvis et al. (2018) onde não houve diferença significativa entre tumores HR-HPV positivos e HR-HPV negativos que afetam pacientes jovens com idade inferior a 40 anos, na análise da expressão das proteínas p16 e p21. No entanto, de forma contrária aos achados dos autores, em nossas amostras houve alta associação entre a expressão de ki67 e presença de HPV.

Assim, não foi possível verificar a associação do aumento da expressão dos marcadores estudados à presença viral, exceto para ki67. Foi possível inferir que leucoplasias com displasia e conseqüentemente maior potencial para transformação neoplásica, apresentam uma tendência a expressar mais p21 e CK14 de maneira moderada, sendo que a expressão de CK19 ocorreu, predominantemente na camada basal de forma similar ao epitélio normal em algumas regiões da cavidade oral. Leucoplasias cujos epitélios não apresentavam displasia não expressaram CK19, havendo menores expressões de p21 e com poucas amostras com expressão acentuada de CK14. Os carcinomas estudados não demonstraram alta taxa proliferativa (Ki67) que diferisse estatisticamente das leucoplasias com ou sem displasia, mas com ampla expressão de CK19 e p21, além de moderada marcação por CK14.

Os resultados indicaram que a expressão de proteínas reguladoras de ciclo celular e diferenciação celular estava relacionada às características de malignidade das lesões, com exceção da p16 que não foi associada estatisticamente nem a malignidade nem a presença de HPV. Foi possível associar apenas a expressão do marcador de proliferação celular Ki67 à interferência viral nesta amostragem.

7 CONCLUSÃO

- A presença de HPV foi encontrada em 27,0% na mucosa oral de pacientes participantes da pesquisa.
- A positividade para p16 não foi associada ao grau de malignidade ou presença de HPV na mucosa oral.
- O aumento da expressão de CK19 relaciona-se ao potencial de malignidade celular pela ampla marcação de todas as camadas epiteliais em carcinomas e negatividade de marcação em leucoplasias sem displasia.
- Foi possível determinar a associação da expressão de CK14 com o grau de malignidade em leucoplasias com displasia e carcinomas que apresentaram marcação de intensidade moderada.
- As amostras HPV-positivas não apresentaram um padrão específico de expressão da CK14 e Ck19 que possibilitasse inferir a interferência viral nas vias moleculares de expressão das citoqueratinas.
- Neste estudo a p21 parece desempenhar papel como um oncogene e tem relação com a malignidade das lesões com maior expressão em leucoplasias com displasia e carcinoma.
- Existe uma associação estatística entre a expressão de ki67 e a presença de HPV, fato não observado em relação ao grau de displasia e malignidade nas amostras analisadas.
- Considerando-se uma gênese multifatorial das lesões, necessário elucidar a contribuição do vírus no processo de proliferação celular no desenvolvimento das lesões.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400, 2009.

ABELLA, N.; BRUN, S.; CALVO, M.; TAPIA, O.; WEBER, J. D.; BERCIANO, M. T.; LAFARGA, M.; BACHS, O.; AGELL, N. Nucleolar disruption ensures nuclear accumulation of p21 upon DNA damage. **Traffic** (Copenhagen, Denmark), v.11, n.6, p.743–755, 2010.

ABREU, P. M. de. **HPV e expressão de p16 como biomarcadores de prognóstico em carcinoma de células escamosas da cavidade bucal**. 2015 Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Centro de Ciências da Saúde- Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2015.

AHMED, A. A. M., SANHOUR, K., GAD ELKARIM AHMED, H., ALAMIN, R., OMER, H. E., & IDRIS, A. M. Expression of EGFR, CK5 and CK19 in oral squamous cell carcinoma tissues from Sudanese patients. **Integrated Journal of British**, v.1, n.4, p.71–75, 2014.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**. New York, Ed. Garland Science, p.1616, 2002.

ALÓ, P. L. ; CICCARELLI, M.; DE FELICE, F.; QUINTILIANI, C.; CORSI, A.; POLIMENI, A. Immunohistochemical Differences in Squamous Precancerous and Cancerous Lesions of the Oral Cavity and the Larynx: Preliminary Data. **Applied Sciences**, v. 11, n. 5, 2021.

AMAGASA, T.; YAMASHIRO, M.; ISHIKAWA, H. Oral leukoplakia related to malignant transformation. **Oral Science International**, v.3, p.45-55, 2012

AMMERMANN, I.; BRUCKNER, M.; MATTHES, F.; IFTNER, T.; STUBENRAUCH, F. Inhibition of transcription and DNA replication by the papillomavirus E8-E2C protein is mediated by interaction with corepressor molecules. **Journal of Virology**, v.82, p.5127– 5136, 2008.

ANDERSON, K.S.; WALLSTROM, G.; LANGSETH, H.; POSNER, M.; CHENG, J.N.; ALAM, R.; CHOWELL, D.; FURRE, I.E.; MORK, J. PreHPV infections and oral manifestations 65diagnostic dynamic HPV16 IgG seropositivity and risk of oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 73, p.132–137, 2017.

ANTONSSON, A.; WILSON, L.; BAIN, C.; WHITEMAN, D. Antonsson et al, **suppl ANZJPH 2015**, 13 out. 2015.

BÁNÓCZY, R. J. C.; SIBA, A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 42, n. 6, p. 766-774, Dec. 1976.

BAUER, H. M.; TING, Y.; GREER, C. E.; CHAMBERS, J. C.; TASHIRO, C. J.; CHIMERA, J.; REINGOLD, A.; MANOS, M. M. Genital human Papillomavirus infection in female University Students as determined by a PCR-Based Method. **Jama**, v. 265, n. 4, p. 472-477, 1991.

BERKOVITZ, B., MOXHAM, B., LINDEN, R., SLOAN, A. **Oral Biology Master Dentistry**, 1 ed, vol. 3, London: Churchill Livingstone, 2011.

BETIOL, J.; VILLA, L. L.; SICHERO, L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 217–226, 2013.

BIXOFIS, R.; SASSI, L.; CLEVERSON, P.; JUNG, J.; IOSHII, S.; SCHUSSEL, J. Significance of p16 Positive Expression in Oropharyngeal Cancers. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 15, p. 10289–92, jan. 2014.

BOGUÑÁ, N.; CAPDEVILA, L.; JANÉ-SALAS, E. The human papillomavirus and its relationship with the pathology of the oral cavity. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 153, jul. 2019.

BRANCA, M.; GIORGI, C.; CIOTTI, M.; SANTINI, D.; DI BONITO, L.; COSTA, S.; BENEDETTO, A.; BONIFACIO, D.; DI BONITO, P.; PABA, P.; ACCARDI, L.; MARIANI, L.; RUUTU, M.; SYRJÄNEN, S.; FAVALLI, C.; SYRJÄNEN, K. Upregulation of telomerase (hTERT) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus, virus persistence, or disease outcome in cervical cancer. **Diagnostic cytopathology**, v.34, n.11, p. 739-748, 2006.

BRIMER, N.; DREWS, C. M.; VANDE POL, S. B. Association of papillomavirus E6 proteins with either MAML1 or E6AP clusters E6 proteins by structure, function, and evolutionary relatedness. **PLoS pathogens**, v.13, n.12, p. e1006781, 2017.

BRISTOL, M. L.; DAS, D.; MORGAN, I. M. Why Human Papillomaviruses Activate the DNA Damage Response (DDR) and How Cellular and Viral Replication Persists in the Presence of DDR Signaling. **Viruses**, v. 9, n.10, p.268, 2017.

BRONIARCZYK, J.; RING, N.; MASSIMI, P.; GIACCA, M.; BANKS, L. HPV-16 virions can remain infectious for 2 weeks on senescent cells but require cell cycle re-activation to allow virus entry. **Scientific Reports**, v.8, p. 811, 2018.

BU J., BU X., PENG C., LIU B., CHEN F. Differences in Expression of EGFR, Ki67 and p-EPK in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.14, n.12, p.2213-2216, dez., 2015.

CALEY, A.; EVANS, M.; POWELL, N.; PALERI, V.; TOMKINSON, A.; URBANO, T.G.; JAY, A.; ROBINSON, M.; THAVARAJ, S. Multicentric human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. **Head and Neck - Journal for the sciences and specialites of the Head and Neck**, v. 37, n. 2, p. 202–208, fev 2015.

CAO, J.; JIN, J.Q.; DENG, D.J.; LIU, H.W. Determinação do papilomavírus humano na leucoplasia oral, líquen plano bucal e carcinoma epidermoide de boca. **Beijing Da Xue Xue Bao**, v.8, n.48(1), p.84-88, 2016.

CASTRO, T.M P.G; NETO, C.E.R.; SCALA, K.A; SCALA, W.A. Manifestações orais associada ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais: revisão bibliografia. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v. 70, n. 4, p. 546-50, 2004.

CHANG, K.; LIN, S.; KWAN, P.; WONG, Y. Association of aberrant p53 and p21 WAF1 immunoreactivity with the outcome of oral verrucous leukoplakia in Taiwan. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 29, n. 2, p. 56–62, 2000.

CHAKROBARTY, B.; CHAKROBARTY, B.; ROY, J. G.; MAJUMDAR, S.; UPPALA, D. Relationship among tobacco habits, human papillomavirus (HPV) infection, p53 polymorphism/mutation and the risk of oral squamous cell carcinoma. **Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP**, v. 18, n. 2, p.211-216, maio. 2014.

CHATTOPADHYAY, K. A comprehensive review on host genetic susceptibility to human papillomavirus infection and progression to cervical cancer. **Indian Journal Human Genetic**, v.17, p.132–144, 2011.

CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **Journal of dental research**, v. 87, n.1, p. 14- 32, 2008.

CRUZ, I.B.; SNIJDERS, P.J.; STEENBERGEN, R.D.; MEIJER, C.J.; SNOW, G.B.; WALBOOMERS, J.M.M.; VAN DER WAAL, I. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. **European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology**. v.32, n.1, p.55-62, 1996.

DARRAGH, T. M.; COLGAN, T. J.; COX, J. T.; HELLER, D. S.; HENRY, M. R.; LUFF, R. D.; MCCALMONT, T.; NAYAR, R.; PALEFSKY, J. M.; STOLER, M. H.; WILKINSON, E. J.; ZAINO, R. J.; WILBUR, D. C.; & MEMBERS OF LAST PROJECT WORK GROUPS. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v.136, n.10, p.266–1297, 2012.

DAY, P.M.; BAKER, C.C.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.39, p.14252–14257, 2004.

DEVI, P. Basics of carcinogenesis. **Health Administration**, v.17, p.16-24, 2004.

DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DIAS, E.M. Tbx2 Is Overexpressed and Plays an Important Role in Maintaining Proliferation and Suppression of Senescence in Melanomas. **Cancer Research**, v. 65, p. 2260 – 2268, 2005.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I.G.; STOLER, M.; BROKER, T.R.; STANLEY, M. A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**. v. 30, n.5, p. 55–70, 2012.

DREER, M.; VAN DE POEL, S.; STUBENRAUCH, F. Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8/E2 protein. **Virus Research**. v. 231, p.96–102, 2017.

DRAGOMIR, L P; SIMIONESCU, C.; MĂRGĂRITESCU, C.; STEPAN A., DRAGOMIR I.M., POPESCU M.R. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, v. 53, n. 1, p. 89–93, 2012.

DUTTO, I.; TILLHON, M.; CAZZALINI, O.; STIVALA, L.A.; PROSPERI, E. Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. **Archives of toxicology**, v. 89, n. 2, p. 155–178, fev. 2015.

EL-MOFTY, S.K., PATIL, S. Human papillomavirus (HPV)-related oropharyngeal nonkeratinizing squamous cell carcinoma: characterization of a distinct phenotype. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. v.101, n.3, p.339-45, 2006.

EZE, N.; LO, Y.-C.; BURTNESS, B. Biomarker driven treatment of head and neck squamous cell cancer.(Report). **Cancers of the Head & Neck**, v. 2, n. 1, 2017.

FANG, K. H.; KAO, H. K.; CHENG, M. H.; CHANG, Y. L.; TSANG, N. M.; HUANG, Y. C.; LEE, L. Y.; YU, J. S.; HAO, S. P.; CHANG, K. P. **Histological differentiation of primary oral squamous cell carcinomas in an area of betel quid chewing prevalence. Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v.141, n.6, p. 743-749, 2009

FARAH, C.S.; WOO, S.B; ZAIN, R.B.; SKLAVOUNOU, A.; MCCULLOUGH, M.J.; LINGEN, M. Oral cancer and oral potentially malignant disorders. **International Journal of Dentistry**, v.2014, n. 853479, 2014.

FARENZENA, K.P.; VIEIRA, R.R.; DE CARLI, J.P.; SILVA, S.O.; LINDEN, M.S.S.; TRENTIN, M.S. Leucoplasia bucal levantamento epidemiológico dos casos encontrados no Serviço de Diagnóstico Histopatológico do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo. **Odonto**, v.20, n.40, p.57-66, 2012.

FERRAZ, L. D. C., SANTOS, A.B.R.; DISCACCIATI, M.G. Ciclo celular , HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical : seleção de marcadores biológicos. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 30, n. 2, p. 107–111, 2012.

FILLIES, T., JOGSCHIES, M., KLEINHEINZ, J., BRANDT, B., JOOS, U., BUERGER, H. Cytokeratin alteration in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, v.18, n.3, p. 639–643, 2007.

FILLIES, T., WERKMEISTER, R., PACKEISEN, J., BRANDT, B., MORIN, P., WEINGART, D., JOOS, U., BUERGER, H. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **BMC Cancer**, v.6, p.10, 2006.

FROHWITTER, G., BUERGER H., VAN DIEST P. J., KORSCHING, E., KLEINHEINZ J., FILLIES, T. Cytokeratin and protein expression patterns in squamous

cell carcinoma of the oral cavity provide evidence for two distinct pathogenetic pathways. **Oncology Letters**. v.12, p.107-113, 2016.

GALVIS, M. M.; JARDIM F. J.; KAMINAGAKURA, E.; SILVA A. R. S.; PHD FONSECA, F. P.; ALMEIDA, C. P.; LOPES, M. AJUDARTE.; PINTO, C. L.; KOWALSKI, L. P. Expression of cell cycle proteins according to HPV status in oral squamous cell carcinoma affecting young patients: a pilot study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 125, n. 4, p. 317–325, abr. 2018.

GHEIT, T. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. **Frontiers on Oncology**, v.9, p.01-22, mai. 2019.

GIBSON, J.S. Nucleic acid-based assays for the detection of high-risk human papillomavirus: a technical review. **Cancer Cytopathology**, v.122, p.639–645, 2014.

GISSI, D.B.; GABUSI, A.; TARSITANO, A.; BADIALI, G.; MARCHETTI, C.; MORANDI, L.; FOSCHINI, M.P.; MONTEBUGNOLI, L. Ki-67 Overexpression in mucosa distant from oral carcinoma: A poor prognostic factor in patients with long-term follow-up. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 44, n.9, p.1430-1435, sep. 2016.

GISSI, D. B.; GABUSI, A.; TARSITANO, A.; LUCCARINI, L.; MORANDI, L.; MONTEBUGNOLI, L. Podoplanin expression as a predictive marker of dysplasia in oral leukoplakia. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 5, p. 759–764, 2018.

GRAVITT, P.E., PEYTON, C.I.; ALESSI, T.Q., WHEELER, C.M., COULÉE, F., HILDSHEIM, A. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357-361, jan. 2000.

GULTEKIN, €. S.E.; SENGUVEN, €. B.; KLUSSMANN, J.P.; DIENES, H.P. P16 (INK 4a) and Ki-67 expression in human papilloma virus-related head and neck mucosal lesions. **Investigacion clinica**, v. 56, n.1, p. 47–59, 2015.

GUO, M., SNEIGE, N., SILVA, E.G. Distribution and viral load freight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Modern Pathology**. v.20, p. 256–266, 2007.

GUPTA, K.; METGUD, R. Evidences Suggesting Involvement of Viruses in Oral Squamous. **Pathology Research International**, v. 2013, p. 1–17, 2013.

HANDAJANI, J.; HANINDRIYO, L. Expression of Cytokeratin 19 in the epithelial cell of Azo-exposed buccal mucosa. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 32, n. 1, p. 132–135, 2018.

HAEDICKE J, IFTNER T. Human papillomaviruses and cancer. **Radiotherapy Oncology**, v.108, p.397–402, 2013.

HAUKIOJA, A.; ASUNTA, M.; SODERLING, E.; SYRJANEN, S. Persistent oral human papillomavirus infection is associated with smoking and elevated salivary immunoglobulin G concentration. **Journal of Clinical Virology**. v. 61, p.101–

106,2014.

HALEC, G.; SCHMITT, M.; DONDOG, B.; SHARKHUU, E.; WENTZENSEN, N.; GHEIT, T.; TOMMASINO, M.; KOMMOSS, F.; BOSCH, F. X.; FRANCESCHI, S.; CLIFFORD, G.; GISSMANN, L.; PAWLITA, M. Biological activity of probable/possible high-risk human papillomavirus types in cervical cancer. **International journal of cancer**, v.132, n.1, p. 63–71, 2013.

HANNA, G. J.; SRIDHARAN, V.; MARGALIT, D. N.; LA FOLLETTE, S. K.; CHAU, N. G.; RABINOWITS, G.; LORCH, J. H.; HADDAD, R. I.; TISHLER, R. B.; ANDERSON, K.; SCHOENFELD, J. D. Salivary and serum HPV antibody levels before and after definitive treatment in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Cancer Biomarkers**, v. 19, n.2, p.129-136, 2017.

HERBIG, U; WEI, W.; DUTRIAUX, A.; JOBLING, W.A; SEDIVY, J.M. Real-time imaging of transcriptional activation in live cells reveals rapid up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene CDKN1A in replicative cellular senescence. **Aging Cell**, v. 2, n. 6, p. 295–304, dez. 2003.

HOGMO, A.; LINDSKOG, S.; LINDHOLM, J.; KUYLENSTIERNA, R.; AUER, G.; MUNCK-WIKLAND, E. Preneoplastic oral lesions: the clinical value of image cytometry DNA analysis, p53 and p21/WAF1 expression. **Anticancer Research**, v.18, p.3645-3650,1998.

HOLMSTRUP, P.; VEDTOFTE, P.; REIBEL, J.; STOLTZE, K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncology**, v. 42, n. 5, p. 461–474, 1 maio 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA) MINISTÉRIO DA SAÚDE. Rio de Janeiro. **Estimativa de Câncer 2018 - 2019. Incidência de Câncer no Brasil**, 01 de agosto de 2019. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp> Acesso em: 21 de janeiro de 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA) MINISTÉRIO DA SAÚDE. Rio de Janeiro. **Estimativa de Câncer 2020 - 2022. Incidência de Câncer no Brasil**, 29 de abril de 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasi> Acesso em: 11 de agosto de 2020.

INSTITUTO DO CÂNCER RIO PRETO. Rio Preto. **Câncer da cavidade oral**. Disponível em: <https://incariopreto.com.br/cancer-da-cavidade-oral/> Acesso em: 13 de outubro de 2021.

JACQUES C.M., PEREIRA AL, MAIA V, CUZZI T, RAMOS-E-SILVA M. Expression of cytokeratins 10, 13, 14 and 19 in oral lichen planus. *Journal of Oral Science*. n. 51, p. 355–65, 2009.

JING, D.Y.; ZHOU, D.Q.; ZHU, D.H., ZHANG, M.Y., SONG D.Y., XIAOXIN, D.Z. Ki-67 is an independent prognostic marker for recurrence and relapse in oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 128, n. 1, p.76, 2019.

KARLSEN, F., KALANTARI, M., JENKINS, A., PETTERSEN, E., KRISTENSEN, G., HOLM, R. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2095-2100, 1996.

KELLOKOSKI, J.; SYRJANEN, € S.; KATAJA, V.; YLISKOSKI, M.; SYRJANEN, € K. Acetwhite staining and its significance in diagnosis of oral mucosa lesions in women with genital HPV infections. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.19, p. 278–283, 1990.

KELLOKOSKI, J.; SYRJÄNEN, S.; TOSI, P.; CINTORINO M, LEONCINI P, SYRJÄNEN K. Cytokeratin pattern in normal and HPV infected oral mucosa in women with genital HPV infections. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 20, n. 1, p. 26–31, 1991.

KIRITA, T., OMURA, K. **Oral Cancers: Diagnosis and Therapy**. 1.ed. Japan:Springer; 2015.

KLIMOWICZ, A. C.; BOSE, P.; NAKONESHNY, S. C.; DEAN, M.; HUANG, L.; CHANDARANA, S.; MAGLIOCCO, A. M.; WAYNE MATTHEWS, T.; BROCKTON, N. T.; DORT, J. C. Basal Ki-67 expression measured by digital image analysis is optimal for prognostication in oral squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 48, n.14, p. 2166– 2174, 2012.

KOBAYASHI T, MARUYAMA S, CHENG J, IDA-YONEMOCHI H, YAGI M, TAKAGI R, SAKU T. Histopathological varieties of oral carcinoma in situ: diagnosis aided by immunohistochemistry dealing with the second basal cell layer as the proliferating center of oral mucosal epithelia. **Pathology Int.**, v.60, n.3, p.156–166, 2010.

KOSS, L.G. Cytologic and histologic manifestations of human papillomavirus infection of the uterine cervix. **Cancer Detect Prevent**, v.14, p.461–464, 1990.

KREIMER AR, CLIFFORD GM, BOYLE, P; FRANCESCO, S. Tipos de papilomavírus humano em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço em todo o mundo: uma revisão sistemática. **Biomarcadores de Epidemiologia de Câncer Prev**, v. 14, p. 467-475, 2005.

KRISANAPRAKORNKIT, S.; IAMAROON, A. Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma. **ISRN Oncology**, v. 2012, p. 681469, mar. 2012.

KUDO, Y.; TAKATA, T.; OGAWA, I.; SATO, S.; NIKAI, H. Expression of p53 and p21CIP1/WAF1 proteins in oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. **Oncology Rep**, v.6, p.539-545, 1999.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease**, 7th edition. Elsevier Saunders; 2005.

KUMAR V., ABBAS A., FAUSTO N., MITCHELL R.N. **Robbins: patologia básica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

KUMAR, S.; BISWAS, M.; JOSE, T. HPV vaccine: Current status and future directions. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 2, p. 171–177, abr. 2015.

KUMAR, P.; KANE, S.; RATHOD, G. P. Coexpression of p53 and Ki 67 and lack of c-erbB2 expression in oral leukoplakias in India. **Brazilian Oral Research**, v. 26, p. 228–234, 2012.

LAJER, C.B, VON BUCHWALD, C.V. The role of human papillomavirus in neck and head cancer. **APMIS**, v.118 p. 509-510, 2010.

LARSEN, S. R.; JOHANSEN, J.; SORENSEN, J. A.; KROGDAHL, A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. **Journal Oral Pathology Medicine**, v.38, p.657-62, 2009.

LEE, J.J.; HONG, W.K.; HITTELMAN, W.N.; MAO, L.; LOTAN, R.; SHIN, D.M. Predicting cancer development in oral leukoplakia: Ten years of translational research. **Clinical Cancer Research**, v.6, p.1702-10, 2000.

LEE, J. H.; LEE, S. Y.; LEE, J. H.; LEE, S. H. p21 WAF1 is involved in interferon- β -induced attenuation of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in ovarian cancer. **Molecules and cells**, v. 30, n.4, p.327–333, 2010.

LEE, J.; HUNG, H.; CHENG, S.; CHEN, Y.J.; CHIANG, C.P.; LIU, B.Y.; JENG, J.H.; CHANG, H.H.; KUO, Y.S.; LAN, W.H.; KOK, S.H. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: prevalence and risk factors. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology**, v.101, p.472-480, 2006.

LERMAN, M.A.; ALMAZROOA, S.; LINDEMAN, N. A.; HALL, D.; VILLA, A.; WOO, S. HPV-16 in a distinct subset of oral epithelial dysplasia. **Modern Pathology**, v.30, p.1646–1654, 2017.

LIAO, S.; DENG, D.; HU, X.; WANG, W.; LI, L.; LI, W.; ZHOU, J.; XU, G.; MENG, L.; WANG, S.; MA, D. HPV16/18 E5, a promising candidate for cervical cancer vaccines, affects SCPs, cell proliferation and cell cycle, and forms a potential network with E6 and E7. **International Journal Molecular Medicine**, v.31, p.20-28, 2013.

LINGEN, M. W.; XIAO, W.; SCHMITT, A.; JIANG, B.; PICKARD, R.; KREINBRINK, P.; PEREZ-ORDONEZ, B.; JORDAN, R. C.; GILLISON, M. L. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v. 49, n. 1, p. 1-8, jan. 2013

LIN, C.Y., CHAO, A., YANG, Y.C., CHOU, H.H., HO, C.M., LIN, R.W. Human papillomavirus typing with a polymerase chain reaction-based genotyping array compared with type-specific PCR. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 4, p. 361-367, 2008.

LINDBERG K., RHEINWALD J.G. Suprabasal 40 kd keratin (K19) expression as an immunohistologic marker of premalignancy in oral epithelium. **American Journal Pathology**.v.134, p.89–98, 1989.

LOPES, V.; MURRAY, P.; WILLIAMS, H.; WOODMAN, C.; WATKINSON, J.; ROBINSON, M. Squamous cell carcinoma of the oral cavity rarely harbours oncogenic

human papillomavirus. **Oral Oncology**, v. 47, n. 8, p. 698–701, ago. 2011. ABREU, P. M. de. **HPV e expressão de p16 como biomarcadores de prognóstico em carcinoma de células escamosas da cavidade bucal**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Centro de Ciências da Saúde- Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2015.

MACHADO, A.P. **Deteção e tipagem de Papilomavirus humano em mucosa oral de indivíduos do sexo masculino**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande -MS. 2013.

MAIA, H.C.M.; PINTO, N.A.S.; PEREIRA, J.S.; MEDEIROS, A.M.C.; SILVEIRA, E.J.D.; MIGUEL, M,C,C. Lesões orais potencialmente malignas: correlações clínico-patológicas. **Einstein, São Paulo**, v.14, p. 35-40, 2016.

MANDÚ, A. L. C.; LIRA, C. R. S.; SILVA, L. P.; ROCHA, T. J., GONZAGA A.K.G.; NASCIMENTO, G.J.F. Study of Immunohistochemical Expression of P53, P21, and P16 Proteins in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 120, n. 2, p. e88–e89, 2015.

MARTÍN-HERNÁN, F.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, J.G.; CANO, J.; CAMPO, J.; DEL ROMERO J. et al. Oral cancer , HPV infection and evidence of sexual transmission. **Medicine Oral Pathology Oral Cirurgia Oral**, v. 18, n. 3, p. 439–444, mai 2013.

MARUR, S.; D'SOUZA, G.R; WESTRA W. H.; FORASTIERE A.A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. **Lancet Oncology**, v. 11, n. 8, p. 781–789, 2010.

MAUCORT-BOULCH, D.; PLUMMER, M.; CASTLE, P.E.; DEMUTH, F.; SAFAEIAN, M.; WHEELER, C.M. Predictors of human papillomavirus persistence among women with equivocal or mildly abnormal cytology. **International Journal of Cancer**, v.126, p. 684–69, 2010.

MCBRIDE, A .A. The papillomavirus E2 proteins. **Virology**, v. 445, p. 57–79. 2013.

MC CORD, C.; XU, J.; XU, W.; QIU, X.; MCCOMB, R.J., PEREZ-ORDONEZ, B.; BRADLEY, G. Association of highrisk human papillomavirus infection with oral epithelial dysplasia. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology**, v.115, n.4, p.541-549, 2013.

MEHRPOUYA, M.; POURHASHEM, Z.; YARDEHNAVI, N.; OLADNABI, M. Evaluation of cytokeratin 19 as a prognostic tumoral and metastatic marker with focus on improved detection methods - Mini-review. **Journal Cell Physiology**. v. 234, p. 21425–21435 , 2019.

MEYERS, J.M.; UBEROI, A.; GRACE, M.; LAMBERT, P.F.; MUNGER, K. Cutaneous HPV8 and MmuPV1 E6 Proteins Target the NOTCH and TGF- β Tumor Suppressors to Inhibit Differentiation and Sustain Keratinocyte Proliferation. **PLoS Pathology**, n.13, v.1 , p.e1006171, jan. 2017.

MIKAMI T., MARUYAMA S., ABÉ T., KOBAYASHI T., YAMAZAKI M., FUNAYAMA A., SHINGAKI S., KOBAYASHI T., JUN C., SAKU T. Keratin 17 is co-expressed with 14-3-3 sigma in oral carcinoma in situ and squamous cell carcinoma and modulates cell proliferation and size but not cell migration. **Virchows Archives**. v.466, n.5, p.559-69, 2015.

MILLER, C.S., JOHNSTONE, B.M. Human papillomavirus as a risk for oral squamous cell carcinoma, 1982-1997. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology**. v.91, p.622-635, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA) [INTERNET]. RIO DE JANEIRO. Estudos mostram que infecção pelo HPV pode estar alterando o perfil dos pacientes com câncer de orofaringe. Rede Câncer. 2014 www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/.../EPIDEMIOLOGIA.pdf?

MOOREN, J.J.; GULTEKIN, €S.E.; STRAETMANS, J.M.; HAESEVOETS, A.; PEUTZ-KOOTSTRA, C.J.; HUEBBERS, C.U.; DIENES, H.P., WIELAND, U.; RAMAEKERS, F.C.; KREMER, B.; SPEEL, E.J.; KLUSSMANN, J.P. P16(INK4A) immunostaining is a strong indicator for highrisk-HPV-associated oropharyngeal carcinomas and dysplasias, but is unreliable to predict low-risk-HPV-infection in head and neck papillomas and laryngeal dysplasias. **International Journal of Cancer**, v.13, p.2108–2117, 2014.

MOLDOVAN, G.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the maestro of the replication fork. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 665–679, 2007.

MOLL, R.; DIVO, M.; LANGBEIN, L. The human keratins: biology and pathology. **Histochemistry and cell biology**, v. 129, n. 6, p. 705–733, jun. 2008.

MORGAN EL, MACDONALD A. Manipulation of JAK/STAT Signalling by High-Risk HPVs: Potential Therapeutic Targets for HPV-Associated Malignancies. **Viruses**. v.12, n.9, p.977, sep.2020 .

MORO, J. S., MARONEZE, M. C.; ARDENGHI, T. M.; BARIN, L. M.; DANESI C. C. Câncer de boca e orofaringe: epidemiologia e análise da sobrevida. **Revista do Instituto Einstein**, v.16, n.2, p.1-5, 2018.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUE, X.; GONZALEZ, A. B. D.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 3, p. 1–10, 2006.

MUHR, L.S.A.; EKLUND, C.; DILLNER, J. Towards quality and order in human papillomavirus research. **Virology**, v.519, p. 74–76, 2018.

NAPIER, S.S.; SPEIGHT, P.M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v.37, n.1, p.1-10, jan. 2008.

NASCIMENTO, A.C. S.; NOCETTI, M. C.; LUGO, L. Z. A.; JACOB, C. M. B.; MACHADO, A. P.; PADOVAN, C. T. J.; FERREIRA, A. M. T.; FERNANDES, C. E. S.; TOZETTII, A. Oncogenic high-risk human papillomavirus in patients with full dentur. **Brazilian Oral Research**, n.33, e.091, 2019.

NEMES, J.A., DELI, L., NEMES, Z., MARTON, I.J. Expression of p16INK4A, p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology**, v.102, n.3, p.344-52, 2006

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; JERRY, E.; BOUQUOT, J.E. **Patologia Oral e Maxilofacial**, 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009.

NOBRE R.J., ALMEIDA L.P., MARTINS T.C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **Journal of Clinical Virology**, v.42, p.13-21, 2008.

OGUEJIOFOR, K. K.; HALL, J.S.; MANI, N.; DOUGLAS, C.; SLEVIN, N.J. Y.; HOMER, J. Z.; HALL, G. Z.; WEST, C.M.L. The prognostic significance of the biomarker p16 in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Clinical Oncology**, v. 25, n. 11, p. 630–8, nov. 2013.

OH, H.Y.; SEO, S.S.; KIM, M.K.; LEE, D.O.; CHUNG, Y. K., LIM, M.C. Synergistic effect of viral load and alcohol consumption on the risk of persistent high-risk human papillomavirus infection. **PLoS ONE**, v.9, 2014.

OKADA, Y.; MORIDE, M. Immunohistochemical Study of Differential Expressions of Cytokeratin-13, -14, -17 and p53 in Epithelial Dysplasia and Carcinoma of the Tongue. **Journal of Hard Tissue Biology**, v. 19, n. 2, p. 123–130, 2010.

PANNONE, G.; RODOLICO, V.; SANTORO A.; MUZIO, L.; FRANCO, R.; BOTTI, G.; AQUINO, G.; PEDICILLO, M. C.; CAGIANO, S.; GIUSEPPINA, C.; RUBINI C.; PAPAGERAKIS, S.; ROSA, G.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, F. M.; STAIBANO, S.; BUFO, P. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. **Infectious agents and cancer**, v. 7, n. 1, p. 4, 2012.

PARFENOV, M.; PEDAMALLU, C. S.; GEHLENBORG, N.; FREEMAN, S. S.; DANILOVA, L.; BRISTOW, C. A.; LEE, S.; HADJIPANAYIS, A. G.; IVANOVA, E. V.; WILKERSON, M. D.; PROTOPOPOV, A.; YANG, L.; SETH, S.; SONG, X.; TANG, J; REN, X.; ZHANG, J.; PANTAZI, A.; SANTOSO, N.; XU, A. W. Cancer Genome Atlas Network. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.111, n.43, p.15544-15549, 2014.

PARAMIO, J.M., JORCANO, J.L. Beyond structure: Do intermediate filaments modulate cell signalling? **Bioessays**, v.24, p.836–844, 2002.

PARLATESCU, I.; GHEORGHE, C.; COCULESCU, E.; TOVARU, S. Oral Leukoplakia – An Update. **Maedica (Buchar)**, v. 9, n.1, p. 88-93, 2014.

PATIL, S.; RAO, R. S.; AMRUTHA, N.; SANKETH, D. S. Analysis of human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma using p16: An immunohistochemical study. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v.4, n.1, p. 61–66, 2014.

PERES, M. A.; MACPHERSON, L. M. D.; WEYANT, R. J.; DALY, B.; VENTURELLI, R.; MATHUR, M. R. Oral diseases: a global public health challenge. **Lancet. Series-Oral Health**, v. 394, n.10194, p. 249-260, jul. 2019.

PÉREZ-SAYÁNS, M.; SUÁREZ-PEÑARANDA, J. M.; GAYOSO-DIZ, P.; BARROS-ANGUEIRA, F.; GÁNDARA-REY, J. M.; GARCÍA-GARCÍA, A. The role of p21Waf1/CIP1 as a Cip/Kip type cell-cycle regulator in oral squamous cell carcinoma (Review). **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v.18, n.2; p. 219–225, 2013.

PETITO, G.; CARNEIRO, M.; APARECIDA, S.; SANTOS, S. H. R., SILVA A. M. T. C.; ALENCAR R. D. C.; GONTIJO A. P. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.83, n. 1, p. 38-44, feb. 2017.

PINTO, A. C.; CARAMÊS, J.; FRANCISCO, H; Chen A., Azul A.M., Marques D. Malignant transformation rate of oral leukoplakia—systematic review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212440320300675>>.

PRABAKARAN, S., MUTHUKRISHNAN, A. Expression of cytokeratin 18 and 19 in oral potentially malignant disorders: A systematic review. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**, v.26, n.2, p.173-177, 2014.

PRIGGE, E.; ARBYN, M.; VON KNEBEL, D.M. ; REUSCHENBACH, M. Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 5, p. 1186–1198, 2017.

PROSPERI, E. The fellowship of the rings: distinct pools of proliferating cell nuclear antigen trimer at work. **FASEB Journal**, v. 20, n. 7, p. 833–837, 2006.

PURGINA, B.; HASSAN, M.; OLBERG, B.; LAI, C.K.; MAI, KIEN T. Histopathogenesis of Non-HPV-related Oral Squamous Differentiated Intraepithelial Neoplasia. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v.23, n. 4, p.273-279, 2015.

QU, W.; JIANG, G.; CRUZ, Y.; CHANG, C. J.; HO, G. Y.; KLEIN, R. S.; BURK, R. D. PCR detection of human Papillomavirus between MY09/11 and GP5+/GP6+ primer sistem. **Journal of clinical microbiology**. v.35, n. 6, p. 1304-1310, 1997.

QUEIROZ, A. B.; FOCCHI, G.; DOBO, C.; GOMES, T.S.; RIBEIRO, D.A.; OSHIMA, C.T .Expression of p27, p21(WAF/Cip1), and p16(INK4a) in normal oral epithelium, oral squamous papilloma, and oral squamous cell carcinoma. **Anticancer research**, v. 30, n. 7, p. 2799, 2010.

RAMOS, R. T.; PAIVA, C. R.; FILGUEIRAS, A.M.O.; SILVA-JUNIOR, G. O.; CANTISANO, M. H; FERREIRA, D. C.; RIBEIRO, M. Leucoplasia Oral: conceitos e repercussões clínicas; Artigo de Revisão de Literatura/Estomatologia. **Revista Brasileira Odontologia**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 1, p. 51-5, jan./mar. 2017.

RAUTAVA, J.; SYRJANEN, €. S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v.142, n.8, p. 905-914, 2011.

REIBEL, J.G.N.; HILLE J. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. **World Health Organization classification of tumors: head and neck tumors**. Lyon: IARC Press, p. 435, 2017.

RIVA, G.; Albano C.; Gugliesi, F.; Pasquero, S.; Pacheco, S. F. C.; Pecorari, G.; Landolfo, S.; Biolatti, M.; Dell'Oste, V. HPV Meets APOBEC: New Players in Head and Neck Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, 2021.

RODRIGUES T.L.C., COSTA L.J., SAMPAIO M.C., RODRIGUES F.G., COSTA A.L.L. Leucoplasias orais: relação clínico-histopatológica. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. São Paulo, v. 14, n. 4, p. 357-361, out./dez., 2000.

ROMANOV, V. S.; POSPELOV, V. A.; POSPELOVA, T. V. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. **Biochemistry Biokhimiia**, v. 77, n. 6, p. 575–584, jun. 2012.

SAFADI, R. A.; ALROMAIZAN, A.; ALSHAGROUD, R. S.; DIVAKAR, D. D.; ALSHIEBAN, S. Cytokeratin 19 Immunostain Reduces Variability in Grading Epithelial Dysplasia of the Non-Keratinized Upper Aerodigestive Tract Mucosa. **Head and Neck Pathology**, v. 14, n. 1, p. 183–191, 2020.

SAFADI, R. A.; ALAAH, N. I.; BADER, D.H.; DIVAKAR, D. D.; HAMASHA, A. A.; SUGHAYER, M.A. Clinical and histopathological prognostic implications of the expression of cytokeratins 8, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 in squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. **Archives of oral biology**, v.99, p.1-8, mar. 2019.

SAITOH, T.; SATO, K.; TONOGLI, M.; TANAKA Y., YAMANE G. Expression of Cytokeratin 13, 14, 17, and 19 in 4-nitroquinoline-1-oxide-induced Oral Carcinogenesis in Rat. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 57, n. 4, p. 241–251, 2016.

SANTACROCE L, DI COSOLA M, BOTTALICO L, TOPI S, CHARITOS IA, BALLINI A, INCHINGOLO F, CAZZOLLA AP, DIPALMA G. Focus on HPV Infection and the Molecular Mechanisms of Oral Carcinogenesis. **Viruses**, v. 26, n.13(4), p.559, mar. 2021.

SANTORO, A., PANNONE, G., NINIVAGGI, R., PETRUZZI, M., SANTARELLI, A., RUSSO, G. M., LEPORE S., PIETRAFESA, M., LAURENZANA, I., LEONARDI, R., BUCCI P. , NATALICCHIO, M. I., LUCCHESI, A., PAPAGERAKIS, S. BUFO, P. Relação entre a expressão CK19, desregulamentação do padrão de diferenciação de queratinócitos normais e infecção pelo vírus do papiloma humano elevado risco no carcinoma epidermoide de boca e orofaringe. **Infectious Agents and Cancer**. v.10, p. 46, 2015.

SCHACHE, A. G.; LILOGLOU, T.; RISK, J. M.; FILIA, A.; JONES, T. M.; SHEARD, J.; WOOLGAR, J. A.; HELLIWELL, T. R.; TRIANTAFYLLOU, A.; ROBINSON, M.; SLOAN, P., HARVEY-WOODWORTH, C., SISSON, D., & SHAW, R. J. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v.17, n.19, p. 6262–6271, 2011.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P.E.; JERONIMO, J.; RODRIGUEZ, A.C.; WACHOLDER, S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v.370, p.890–907, 2007.

SENBA, M.; MORI, N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. **Oncology Reviews**, v.6, p.17, 2012.

SILVA, A.M.T.C., CRUZ, A.D., SILVA, C.C., BORGES, F.R., CURADO, M.P. Genotipagem de Papiloma Vírus Humano em paciente com papilomatose laríngea recorrente. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 49, n. 3, p. 167-174, 2003.

SILVA, V. R. da. **O impacto da marcação imuno-histoquímica para p16 e Ki-67 na reprodutibilidade diagnóstica das biopsias do colo uterino**. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, 2017.

SIMONATO, L.E.; TOMO, S.; GARCIA, J.F.; VERONESE, L.A.; MIYAHARA, G.I. HPV detection in floor of mouth squamous cell carcinoma by PCR amplification. **Journal Brazilian Patology Medicine Laboratorial**, v.52, p.43-49, 2016.

SINANOGU, A., SOLUK-TEKKESIN, M., OLGAC, V. Cyclooxygenase-2 and Ki67 Expression in Oral Leukoplakia: a Clinicopathological Study. **Journal of oral & maxillofacial research**, v.6, n2, p1-8, 2015.

SINGHI, A. D.; WESTRA, W. H. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. **Cancer**, v. 116, n. 9, p. 2166-2173, mai. 2010.

SOBRAL, A. P. V.; ALMEIDA, H. C. R.; FONTES, J. P. S. Correlação do Papilomavírus Humano com o Carcinoma Epidermoide Bucal: Revisão Sistemática. **Revista Cirurgia Traumatologia Buco-maxilo-facial** [online], v.14, n.2, p. 95-102, 2014.

SRITIPPHO, T.; CHOTJUMLONG, P.; IAMAROON, A., “Roles of Human Papillomaviruses and p16 in Oral Cancer,” **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, vol. 16, n. 15, p. 6193–6200, oct. 2015.

STAQUET, M J.; VIAC, J.; THIVOLET, J. Keratin polypeptide modifications induced by human papilloma viruses (HPV). **Archives of Dermatological Research**, v. 271, n. 1, p. 83–90, ago. 1981.

STEPP, W. H.; MEYERS, J. M.; MCBRIDE, A. A. Sp100 provides intrinsic immunity against human papillomavirus infection. **mBio**, v. 4, n. 6, p. e00845, 5 nov. 2013.

SUN, Q.; TSUTSUMI, K.; YOKOYAMA, M.; PATER, M.M.; PATER A. In vivo cytokeratin expression pattern of stratified squamous epithelium from human papillomavirus-type-16-immortalized ectocervical and foreskin keratinocytes. **International Journal Cancer**, v. 54, n.4, p.656–662, 1993.

SUNDBERG, J.; KORYTOWSKA, M.; MIRANDA BURGOS, P.; BLOMGREN, J.; BLOMSTRAND, L.; LARA, S.; SAND, L.; HIRSCH, J.; HOLMBERG, E.; GIGLIO, D.; ÖHMAN, J.; KOVÁCS A.; HORAL, P.; LINDH, M.; KJELLER, G.; HASSÉUS, B. 2019. Combined testing of p16 tumour-supressor protein and human papillomavirus in patients with oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, v.39, n.3, p.1293-1300, 2019.

SWAN, D.C., TUCKER, R.A., TORTOLERO-LUNA, G., MITCHELL, M.F., WIDEROFF, L., UNGER, E.R. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV Type. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.4, p.1030-1034,1999.

SUMIDA, T., HAMAKAWA, H. Telomerase and oral cancer. **Oral Oncology**, v.37, p. 333-340, 2001.

SUNDBERG, J.; KORYTOWSKA, M.; MIRANDA BURGOS, P.; BLOMGREN, J.; BLOMSTRAND, L.; DE LARA, S.; SAND, LARS; HIRSCH, J.; HOLMBERG, E.; GIGLIO, D.; ÖHMAN, J.; KOVÁCS, A.; HORAL, P.; LINDH, M.; KJELLER, G.; HASSÉUS, B. Combined testing of p16 tumour-supressor protein and human papillomavirus in patients with oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**. v. 39, n.3, p.1293-1300, 2019.

SYRJÄNEN, S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. **European Journal of Oral Sciences**, v. 126, n. S1, p. 49–66, 1 out. 2018.

SYRJÄNEN, S.; CINTORINO, M.; ARMELLINI, D.; DEL VECCHIO, M.T.; LEONCINI, P., BUGNOLI, M., PALLINI, V.; SILVESTRI, S.; TOSI, P.; MÄNTYJÄRVI, R. Expression of cytokeratin polypeptides in human papillomavirus (HPV) lesions of the uterine cervix: 1. Relationship to grade of CIN and HPV type. **International Journal of Gynecology Pathology**, v.7, n.1, p.23-38, 1988.

TORRAS C.C., ESCODA C.G. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 20, n.3, p.305-15, 2015.

TORRES-RENDON, A; ROY, S; CRAIG, G T; SPEIGHT P.M. et al. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *British journal of cancer*, v. 100, n. 7, p. 1128–1134, 2009.

TORRES-ROJAS, F. I.; ALARCÓN-ROMERO, L.; LEYVA-VÁZQUEZ, M. A.; ORTIZ-ORTIZ, J.; MENDOZA-CATALÁN, M. Á.; HERNÁNDEZ-SOTELO, D.; DEL MORAL-HERNÁNDEZ, O.; RODRÍGUEZ-RUIZ, H. A.; LEYVA-ILLADES, D.; FLORES-ALFARO, E.; ILLADES-AGUIAR, B. Methylation of the L1 gene and integration of human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinoma and premalignant lesions. **Oncology letters**, v.15, n.2, p. 2278-2286, 2018.

VALASH J., FOLTAN, R., VLK, M., SZABO P., SMETANA JR, K. Phenotypic characterization of oral mucosa: what is normal? **Journal Oral Pathology & Medicine**. v.46, n.9, p. 1-5, jan. 2017.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Cancer Management. Pitfalls and Solutions**, v. 45, n. 4, p. 317–323, abr. 2009.

VAN DOORSLAER, K.; CHEN, Z.; BERNARD, H.U.; CHAN, P.K.S.; DESALLE, R.; DILLNER, J.; FORSLUND, O.; HAGA, T.; MCBRIDE, A. A.; VILLA, L. L.; BURK, R. D.; ICTV REPORT CONSORTIUM. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **Journal of General Virology Microbiology Society**, v. 99, p. 989–90, 2018.

VASCONCELOS, S. B. S.; TOZETTI, I. A.; ANTUNES, D. M.; CARDOSO, A. I. Q.; IVO, M. L. Human Papillomavirus (HPV) in leukoplasia and epidermoid carcinoma of the oral cavity: A systematic review. **International Journal of Development Research**, v.10, n. 03, p. 34272-34276, Mar. 2020.

VÉKONY, H., RÖSER, K., LÖNING, T., RAAPHORST, F.M., LEEMANS, C.R., VAN DER WAAL I., LOEMENA, E. Deregulated expression of p16INK4a and p53 pathway members in benign and malignant myoepithelial of the salivary glands. **Histopathology**. v.6, n. 53, p.658-666, 2008.

VIEIRA, R. A. M. A. R.; MINICUCCI, E.M.; MARQUES, M.E.; MARQUES, A.S. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 1, p. 105–114, 2012.

VINCENT, T.L.; GATENBY, R.A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **International Journal Oncology**, v.32, p.729-737, 2008.

WAGNER, V. P.; CARDOSO, P. R.; DOS SANTOS, J. N.; Immunohistochemical Study of TGF- β 1 in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma: Correlations Between Clinicopathologic Factors and Overall Survival. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 25, n. 9, p. 651–659, 2017.

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Transformação maligna da leucoplasia oral: uma revisão sistemática de estudos observacionais. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v.45, p. 155 – 166, 2016.

WALBOOMERS J.M., JACOBS M.V., MANOS M.M. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. v.189, p.12–9, 1999.

WESTRA, W. H. The Changing Face of Head and Neck Cancer in the 21st Century : The Impact of HPV on the Epidemiology and Pathology of Oral Cancer. *Head and Neck Pathology*, v. 3, p. 78–81, 2009.

WITKIEWICZ, A.K.; KNUDSEN, K.E.; DICKER, A.P.; KNUDSEN, E.S. The meaning of p16ink4a expression in tumors: Functional significance, clinical associations and future developments. **Cell Cycle**, v.10, n.15, p. 2497-2503, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Oral Health**, 25 de março de 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health> Acesso em: 02 de julho de 2021.

YOSHIDA K., SATO K., TONOGI M., TANAKA Y., YAMANE G.Y., KATAKURA A. Expression of Cytokeratin 14 and 19 in Process of Oral Carcinogenesis. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v.56, n.2, p.105-11, 2015.

ZHANG, Z. Y., SDEK, P., CAO, J., CHEN, W. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *International Journal Oral Maxillofacial Surgery*, v. 33, n. 1, p. 71-4, 2004.

ZHONG, L., CHEN, W., ZHANG, C., ZHANG, Z. Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.104, n.3, p.377-384, sep. 2007.

ZHU, S., SCHUERCH, C., HUNT J. Review and Updates of Immunohistochemistry in Selected Salivary Gland and Head and Neck Tumors. **Archives Pathology & Laboratory Medicine**. v. 139, p.55–66, 2015.

ZOBEL, T.; IFTNER, T.; STUBENRAUCH, F. The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins. **Molecular Cell Biology**, v.23, p.8352-62, 2003.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Estudo: Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular.**

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado, com o objetivo de pesquisar a relação do vírus HPV com lesões de boca. Os dados fornecidos por você para este estudo, bem como os resultados de seus exames, serão pr e protegidos, sendo utilizados apenas para fins desta pesquisa, jamais associados a sua identidade. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você, ou seja, você continuará recebendo o atendimento odontológico que havia sido planejado.

Eu, _____ (somente as iniciais), abaixo assinado (a) concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo intitulado: **Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular**. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

1. O estudo se faz necessário para que se possa contribuir para o conhecimento da relação do HPV com o desenvolvimento de lesões em boca, melhorar o diagnóstico da infecção por Papilomavírus humano (HPV), bem como prevenir de forma mais eficaz o câncer de boca;
2. Após meu consentimento responderei a um questionário com perguntas fechadas e mistas, relacionadas a fatores sócio-comportamentais, necessárias ao estudo cuja resposta será mantida em sigilo.
3. Após meu consentimento será realizada uma coleta por esfoliação ou descamação com uma pequena escova, de lesões pré-estabelecidas da cavidade oral, sendo este método forma padrão de coleta para análise deste tipo de amostra, totalmente seguro, não invasivo, não oferecendo nenhum risco e com o mínimo de desconforto possível;
4. Após meu consentimento será realizada também uma coleta por biópsia, de lesões pré-estabelecidas da cavidade oral, por procedimento padrão necessário para diagnóstico e condutas de tratamento, mesmo em pacientes que são atendidos nas clínicas e que não fazem parte da pesquisa. O risco de desconforto existente, como dor ou edema, será minimizado ao máximo com o uso de anestesia local e com a prescrição de analgésicos e anti-inflamatórios.
5. A participação neste projeto não me acarretará qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados, e estou ciente que não receberei nenhuma forma de pagamento pela minha participação neste estudo;
6. Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
7. Estou ciente que ao final do projeto a amostra coletada por esfoliação será descartada de forma adequada, as lâminas e blocos utilizados para a análise histopatológica e imunohistoquímica serão devolvidas para o arquivo da Disciplina de Patologia Bucal da FAODO-UFMS.
8. A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
9. Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo absoluto, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
10. Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa;

11. Estou ciente que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
12. Caso tenha alguma dúvida ou reclamação posso entrar diretamente em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo telefone: 3345-7387.

(OBS: Caso concorde em participar do estudo proposto, por favor rubrique a primeira página deste termo de consentimento livre e esclarecido)

- () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Paciente (Assinatura): _____

Pesquisadora Responsável

Simone Bertozi de Souza Vasconcelos

(67) 3345 7318

Campo Grande, _____ de _____ de _____.

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO SOCIOEPIDEMIOLÓGICO

Projeto: Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular.

Data: ____/____/____

Código: _____

1. Idade: _____
 2. Raça: () Branca () Preta () Parda () Amarela () Indígena (Fonte: IBGE)
 3. Estado civil?
() solteiro () casado/com companheira () viúvo () separado
 4. Nível de Escolaridade
() Analfabeto () Fundamental () Nível médio () Ensino Superior () Pós Graduação
 5. Idade da primeira relação sexual: _____
 6. Número de parceiros-(as) sexuais nos últimos dois anos: _____
 7. Número aproximado de parceiros-(as) sexuais desde a primeira relação sexual: _____
 8. Faz uso de preservativo (camisinha)?
() Não () Sim
 9. Pratica sexo oral?
() Não () Sim
 10. Faz uso de drogas?
() Não () Sim Qual: _____
 11. Relato de Doença Sexualmente Transmissível (DST)
() Não () Sim Qual: _____
 12. Faz uso do tabaco (cigarro, cachimbo, fumo)?
() Não () Sim
- Há quanto tempo? () 6 meses ou menos () 1 a 2 anos () 3 a 5 anos () + de 5 anos
13. Ingestão de Álcool?
() Não () Sim
- Com que frequência? () diária () 3 vezes por semana () 2 ou menos vezes por semana
- Qual a bebida? () cerveja () cachaças, destilados, uísque
14. Faz uso de algum remédio (medicamento) controlado?
() Não () Sim Qual: _____
 15. Já apresentou alguma lesão na boca?
() Não () Sim Qual: _____
 16. Se sim, para a pergunta anterior, realizou algum tratamento?
() Não () Sim Qual: _____
 17. Usa prótese dentária?
() Não () Sim Qual tipo?: _____

ANEXO I



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que autorizo a coleta de amostras da cavidade oral dos pacientes voluntários atendidos nas clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Faodo/UFMS), com a finalidade de participar do projeto de pesquisa **“Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular”**, que será desenvolvido pela pesquisadora **Professora Simone Bertozzi de Souza Vasconcelos (INBIO/UFMS)**.

Campo Grande, 28 de setembro de 2017.

Paulo Zárate Pereira
Diretor da Faodo

ANEXO II



**PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO GRANDE
ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE**

C.I. N. 3.165/GEP/SESAU/2019, 13 de Fevereiro de 2019.

DE: Gerência de Educação Permanente - SESAU

PARA: Christiane Lima da Silva - Chefe de Divisão Odontológico

ASSUNTO: Autorização

Informo que o projeto de pesquisa da pesquisadora Simone Bertozi de Souza Vasconcelos, com o título do projeto Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular.

Segue anexa a autorização do Comitê de Ética.

Informo que o pesquisador irá identificado para efetuar a coleta de informações, contato: 67 992839779 e e-mail: simonebertozi@yahoo.com.br

Atenciosamente,

José Alexandre dos Santos
Assessor Executivo Iii

ANEXOIII



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular(2).

Pesquisador: SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 87378918.7.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.621.049

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora ressaltar o contexto de que a leucoplasia é a lesão potencialmente neoplásica mais comum da cavidade oral, sendo considerada de maior risco para o desenvolvimento do câncer bucal. Entretanto, os fatores etiopatogênicos que determinam a sua transformação neoplásica permanecem obscuros. Apesar de existirem estudos a respeito do perfil de expressão de proteínas de proliferação (ki 67), diferenciação (citoqueratina 14 e 19) e ciclo celular (p16, p21) em leucoplasias e carcinoma epidermoide oral, há controvérsia se alterações nestes eventos celulares podem estar relacionadas a tipos oncogênicos de Papilomavírus humano (HPV). Os fatores de risco reconhecidos para o carcinoma de epidermoide, tais como o tabaco, o álcool, a radiação ultravioleta e a infecção pelo HPV, são fatores de risco também para a leucoplasia. Assim, o presente estudo descritivo observacional, de corte transversal, com amostragem do tipo não probabilístico por conveniência, analisará esfoliados de células da cavidade oral e biópsia de lesão oral de indivíduos afetados atendidos de julho de 2018 a julho de 2020, nas Clínicas da Faculdade de Odontologia (FAODO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande-MS, buscando investigar a correlação da infecção pelo HPV com os mecanismos de proliferação, diferenciação e ciclo celular que acarretam a transformação neoplásica das leucoplasias.

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 2.621.049

Critério de Inclusão:

- Pacientes de ambos os sexos, acima de 18 anos de idade, e que apresentarem lesões em mucosa oral, classificadas clinicamente como leucoplasia e/ou carcinoma epidermoide oral (CEO), que estiverem de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critério de Exclusão:

- Pacientes menores de 18 anos de ambos os sexos, gestantes e pacientes que não apresentem lesões em mucosa oral, classificadas clinicamente como leucoplasia e/ou carcinoma epidermoide oral (CEO).

O tamanho estimado da amostra é de 125 indivíduos, sendo 25 indivíduos em cada um dos seguintes grupos: Epitélio com displasia moderada, Epitélio com displasia discreta, Carcinoma epidermoide, Epitélio sem displasia, Epitélio com displasia intensa.

Objetivo da Pesquisa:

"Correlacionar a presença do Papilomavírus humano (HPV) com marcadores de proliferação e diferenciação celular, em leucoplasia e carcinoma epidermoide orais."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Riscos previstos pela pesquisadora: "Neste projeto será realizada uma coleta de células da cavidade oral por esfoliação ou descamação com uma pequena escova, sendo este método forma padrão de coleta para análise deste tipo de amostra, totalmente seguro, não invasivo, não oferecendo risco algum. Também será realizada uma coleta por biópsia, de lesões pré-estabelecidas da cavidade oral, por procedimento padrão necessário para diagnóstico e condutas de tratamento, mesmo pacientes que são atendidos nas clínicas e que não fazem parte da pesquisa deverão submeter-se a este procedimento para tratamento e diagnóstico, sempre por profissional odontólogo treinado." "O risco de desconforto, com o surgimento de dor e edema, durante a realização da biópsia será minimizado ao máximo com o uso de anestesia local e prescrição de analgésicos e anti-inflamatórios, se necessário."

- Benefícios previstos pela pesquisadora: "Os participantes da pesquisa terão como benefício o acompanhamento pós-cirúrgico da biópsia realizada, além do encaminhamento para tratamento na FAODO quando necessária à remoção cirúrgica de área maior ou acompanhamento para detecção de recidivas da lesão. Os participantes diretamente envolvidos no estudo serão

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
UF: MS Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 2.621.049

prontamente beneficiados, pois poderão usufruir, nas clínicas da FAODO, do estabelecimento de uma rotina de diagnóstico, tratamento e acompanhamento clínico mais adequado e bem direcionado ao tipo de lesão diagnosticada." "Poderão ser beneficiados também, pacientes acometidos pelas lesões em estudo, tanto a médio como em longo prazo, uma vez que marcadores prognósticos podem ser incorporados à rotina diagnóstica, auxiliando na definição de um prognóstico mais preciso e conseqüentemente na conduta terapêutica."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Vide itens abaixo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Foram anexados: Projeto detalhado, modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Declaração de uso de material biológico, Carta de Anuência do Diretor da FAODO, Carta de Anuência do Diretor do Instituto de Biociências (autorizando a utilização das instalações e equipamentos dos Laboratórios de Imunologia e Histologia do Instituto para execução do Projeto), Termo de compromisso para utilização de informações de prontuário, Termo de compromisso para utilização de informações de bancos de dados, Instrumentos de coleta de dados, Cronograma e Orçamento da pesquisa.

Recomendações:

No final do TCLE, no campo para assinatura, trocar o termo "paciente" por participante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Apresenta todos os itens necessários para aprovação do projeto de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1109179.pdf	09/04/2018 16:29:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOSimone.docx	09/04/2018 16:23:12	SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TLCE.docx	09/04/2018 16:21:46	SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS	Aceito

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 2.621.049

Ausência	TLCE.docx	09/04/2018 16:21:46	SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/04/2018 16:20:30	SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPO GRANDE, 25 de Abril de 2018

Assinado por:
Geraldo Vicente Martins
(Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
UF: MS Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br